การคัดกรองยีสต์ที่ผลิตบีตากลูแคนและภาวะเหมาะสมในการผลิตบีตากลูแคน

นางสาวนิชนันท์ ชวนชื่น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2551
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

SCREENING OF β–GLUCAN PRODUCING YEAST AND OPTIMIZATION FOR β–GLUCAN PRODUCTION

Miss Nitchanan Chuanchuen

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology

Department of Microbiology
Faculty of Science
Chulalongkorn University

Academic Year 2008

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดกรองยีสต์และภาวะเหมาะสมในการผลิตบีตากลูแคนจากยีสต์
โดย	นางสาวนิชนันท์ ชวนชื่น
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม (ถ้ามี)	ดร.วัลลภา อรุณไพโรจน์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ดร.วัลลภา อรุณไพโรจน์)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นิชนันท์ ชวนชื่น : การคัดกรองยีสต์และภาวะเหมาะสมในการผลิตบีตากลูแคนจากยีสต์. (SCREENING AND OPTIMIZATION FOR β–GLUCAN PRODUCTION FROM YEAST) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผศ.ดร.ชาญวิทย์ โมษิตานนท์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ดร.วัลลภา อรุณไพโรจน์ , 91หน้า.

ได้วิเคราะห์ปริมาณบีตากลูแคนจากยีสต์ 127 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากตัวอย่างดินและผลไม้สุกจำนวน 55 ตัวอย่าง ที่สุ่มเก็บจาก 10 จังหวัดในประเทศไทย เพื่อการวิเคราะห์ปริมาณบีตากลูแคน และยีสต์ 20 สายพันธุ์จากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) พบว่ายีสต์ 5 สายพันธุ์ ที่มีปริมาณบีตากลูแคนสูง ได้แก่ ยีสต์สายพันธุ์ *Debaryomyces hansenii* TISTR5155 *Kluyveromyces marxianus* TISTR5116 *Candida parapsilosis* TISTR5904 *Kloeckera apiculata* TISTR5090 และ *Candida krusei* TISTR5905 ตามลำดับ ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตบีตากลูแคนเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว YM คือ กลูโคส 5% น้ำหนักต่อปริมาตร สารสกัดจากยีสต์ 0.3% และ เพพโตน 0.5% น้ำหนักต่อปริมาตร โดยใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่ 5% โดยปริมาตรและปรับค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 เลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อัตราเร็ว 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส วิเคราะห์ปริมาณบีตากลูแคนที่ 24 ชั่วโมง พบว่ายีสต์สายพันธุ์ *Debaryomyces hansenii* TISTR5155 และ *Candida parapsilosis* TISTR5904 ให้ปริมาณบีตากลูแคนสูงที่สุดคือ 1.06 และ 1.65 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อใช้ภาวะดังกล่าวเลี้ยงในระดับถังหมักแบบกะ พบว่ายีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์ให้ปริมาณบีตากลูแคนที่สูงขึ้นโดยที่ *Debaryomyces hansenii* TISTR5155 และ *Candida parapsilosis* TISTR5904ให้ปริมาณบีตากลูแคน 1.24 และ 3.19 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ สายพันธุ์ยีสต์ที่คัดเลือกและจัดจำแนกชนิด *Candida parapsilosis* TISTR5904 และ *Candida krusei* TISTR5905 ได้ฝากเก็บไว้ ณ ศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต นิชนันท์ ชวนชื่น

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ปีการศึกษา 2551 ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

487 23366 23 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEYWORDS : β–GLUCAN / YEAST / OPTIMIZATION

NITCHANAN CHUANCHUEN : SCREENING AND OPTIMIZATION FOR β–GLUCAN PRODUCTION FROM YEAST. THESIS ADVISOR : ASST.PROF. CHARNWIT KOSITANONT, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR : VULLAPA ARUNPAIROJANA, 91 pp.

In the present study, 127 yeast strains were isolated from 55 soil and ripe fruit samples which collected from 10 provinces in Thailand. They were used in examining the β-glucan content including 20 strains obtained from the Microbiological Resources Centre (Bangkok-MIRCEN), The Thailand Institute of Scientific and Technological Research (TISTR).The 5 selected strains, *Debaryomyces hansenii* TISTR5155, *Kluyveromyces marxianus* TISTR5116, *Candida parapsilosis* TISTR5904 *Kloeckera apiculata* TISTR5090 and *Candida krusei* TISTR5905, showed the highest β-glucan content. The optimal condition in YM medium were 5% glucose w/v, 0.3% w/v of yeast extract and 0.5% w/v of peptone with 5% inoculums v/v, initial pH of 5.0, 200 rpm shaking and 30°C. At 24th hours, the yeast strain *Debaryomyces hansenii* TISTR5155 and *Candida parapsilosis* TISTR5904 exhibited the highest β-glucan content of 1.06 and 1.65 g/L, respectively. β-glucan content of both strains were of 1.24 and 3.19 g/L when cultivated batchwise in a fermenter. The new isolated strains with high potential for β-glucan production, *Candida parapsilosis* TISTR5904 and *Candida krusei* TISTR5905 were deposited at Bangkok-MIRCEN, TISTR.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Department : Microbiology	Student's Signature N. Chuanchuen
Field of Study : Industrial Microbiology	Advisor's Signature C. Kositanont
Academic Year : 2008	Co-Advisor's Signature V. Arunpairojana

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างยิ่งของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และดร. วัลลภา อรุณไพโรจน์ ที่ได้ให้คำแนะนำตลอดจนข้อคิดเห็นต่าง ๆ รวมทั้งได้ช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ผู้วิจัยจึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์และได้ให้ข้อคิดเห็นข้อแนะนำ ที่ช่วยทำให้การแก้ไขปรับปรุงของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ และรองศาสตราจารย์ ดร. พลกฤษณ์ แสงวณิช ที่กรุณารับเป็นกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ และได้ให้ข้อคิดเห็นข้อแนะนำที่ช่วยทำให้การแก้ไขปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยาที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆและขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาที่คอยให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการทำวิทยานิพนธ์ด้วยดีตลอดมา

ขอขอบคุณคุณลาวัลย์ คุณสุสกุล และบุคลากรในสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ที่ช่วยเหลือในด้านข้อมูลของจุลินทรีย์ รวมถึงบริษัท สเปเชียลตี้ ไบโอเทค จำกัด (Specialty Biotech Co;Ltd.) สำหรับความอนุเคราะห์ผลิตภัณฑ์ Innovacan™

ขอขอบคุณเพื่อนๆพี่ๆ น้องๆสมาชิกห้องวิจัย 453 ทุกคนที่คอยช่วยเหลือ และคอยให้กำลังใจตลอดการทำวิจัย

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา พี่สาวและครอบครัวของข้าพเจ้า ซึ่งคอยเป็นกำลังใจที่ดีให้ตลอดมาและช่วยเหลือสนับสนุนตลอดการทำวิจัยนี้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ
กิตติกรรมประกาศ..... ฉ
สารบัญ..... ช
สารบัญตาราง..... ญ
สารบัญภาพ..... ฎ
คำย่อ..... ฐ
บทที่.....

1. บทนำ..... 1
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 4
   - 2.1 ยีสต์ (Yeast) 4
   - 2.2 องค์ประกอบและโครงสร้างของเซลล์ยีสต์ (Yeast composition)..... 6
   - 2.3 ผนังเซลล์ของยีสต์(Yeast Cell Wall)..... 7
   - 2.4 บีตากลูแคน (β-glucan) 11
   - 2.5 ประโยชน์ของบีตากลูแคน..... 12
   - 2.6 แหล่งของบีตากลูแคน..... 15
   - 2.7 การสังเคราะห์บีตากลูแคนของยีสต์..... 18
   - 2.8 ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างบีตากลูแคน..... 19
   - 2.9 การสกัดบีตากลูแคนจากผนังเซลล์ยีสต์..... 20
   - 2.10 การเพาะเลี้ยงยีสต์ในอุตสาหกรรม..... 23
   - 2.11 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตบีตากลูแคน..... 24
3. อุปกรณ์เคมีภัณฑ์และวิธีดำเนินงานวิจัย..... 25
   - 3.1 อุปกรณ์..... 25
   - 3.2 เคมีภัณฑ์..... 27
   - 3.3 วิธีดำเนินการวิจัย..... 29
     - 3.3.1 การเก็บตัวอย่าง..... 29

บทที่ หน้า

3.3.2 การคัดแยกยีสต์จาก ตัวอย่าง..... 29
3.3.3 การเก็บรักษายีสต์ที่ใช้ในงานวิจัย..... 29
3.3.4 การคัดกรองยีสต์เพื่อศึกษาปริมาณบีตากลูแคน..... 29
3.3.5 การเตรียมหัวเชื้อเพื่อเลี้ยงยีสต์ในการผลิตบีตากลูแคน..... 30
3.3.6 การเลี้ยงยีสต์เพื่อผลิตบีตากลูแคน..... 30
3.3.7 การวิเคราะห์ปริมาณบีตากลูแคนจากยีสต์ที่คัดเลือกได้..... 31
3.3.8 การจัดจำแนกสายพันธุ์ยีสต์..... 33
4. ผลและวิจารณ์การทดลอง..... 35
4.1 ลักษณะของตัวอย่าง..... 35
4.2 การคัดกรองยีสต์..... 35
4.3 การวิเคราะห์ปริมาณบีตากลูแคนของยีสต์ที่คัดเลือกได้..... 35
4.4 การจัดจำแนกสายพันธุ์ยีสต์..... 43
4.5 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตบีตากลูแคนในระดับขวดเขย่า..... 48
4.5.1 การแปรผันแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตบีตากลูแคน..... 48
4.5.2 การแปรผันปริมาณคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตบีตากลูแคน..... 52
4.5.3 การแปรผันปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตบีตากลูแคน..... 55
4.5.4 การแปรผันปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมในการผลิตบีตากลูแคน..... 58
4.5.5 การแปรผันอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตบีตากลูแคน..... 61
4.5.6 การแปรผันค่าความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมในการผลิตบีตากลูแคน..... 64
4.6 การศึกษาการผลิตบีตากลูแคนในระดับถังหมัก 67
5. สรุปผลการทดลอง..... 71
รายการอ้างอิง..... 75

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ หน้า

ภาคผนวก..... 81

ภาคผนวก ก..... 82

ภาคผนวก ข..... 83

ภาคผนวก ค..... 85

ภาคผนวก ง..... 88

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 91

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	โพลีแซคคาไรด์ชนิดต่างๆที่พบที่ผนังเซลล์ของพวก fungi ……	9
3.1	แสดงสายพันธุ์ยีสต์ที่นำมาจากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)…….……....	28
4.1	แสดงแหล่งที่มา ลักษณะของตัวอย่างดินและจำนวนยีสต์ที่แยกได้……..…	36
4.2	แสดงแหล่งที่มา ลักษณะของตัวอย่างไม้และจำนวนยีสต์ที่แยกได้…….....….	38
4.3	แสดงรายละเอียดข้อมูลของตัวอย่างและยีสต์ที่คัดแยกได้……..……..	39
4.4	แสดงสายพันธุ์ยีสต์ที่นำมาจากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ที่กำหนดรหัสเพื่อใช้ในงานวิจัยครั้งนี้……..…	41
4.5	รูปแบบการใช้คาร์โบไฮเดรตของยีสต์สายพันธุ์ F17 และ F18 โดยใช้ชุดทดสอบ API ID 32 C ที่เวลา 48 ชั่วโมง……..	43
4.6	แสดงผลการทดลองการแปรผันแหล่งคาร์บอนในการผลิตบีตากลูแคน……...	51
4.7	แสดงผลการทดลองการแปรผันปริมาณคาร์บอนในการผลิตบีตากลูแคน……	54
4.8	แสดงผลการทดลองการแปรผันปริมาณไนโตรเจนในการผลิตบีตากลูแคน…..…	57
4.9	แสดงผลการทดลองการแปรผันปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นในการผลิตบีตากลูแคน..	60
4.10	แสดงผลการทดลองการแปรผันอุณหภูมิในการผลิตบีตากลูแคน…..……..	63
4.11	แสดงผลการทดลองการแปรผันค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นในการผลิตบีตากลูแคน……	66
4.12	แสดงผลการทดลองในการเลี้ยงยีสต์ *D. hansenii* TISTR5155 และ *C. parapsilosis* ในถังหมัก……..……	69

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

รูปที่		หน้า
2.1	ลักษณะโดยทั่วไปของเซลล์ยีสต์.....	5
2.2	แสดงองค์ประกอบโดยรวมของเซลล์ยีสต์.....	6
2.3	โครงสร้างของผนังเซลล์ของ yeast	7
2.4	โครงสร้าง β-(1,3)/(1,6)-D-glucan.....	11
2.5	แสดงรูปแบบของบีตากลูแคนในแหล่งต่างๆ.....	15
2.6	โครงสร้างของ β-(1,3),(1,4)-D-glucan ซึ่งพบในเมล็ดธัญพืช.....	15
2.7	โครงสร้างของ laminarin ที่พบในพวกสาหร่าย.....	16
2.8	เซลล์ยีสต์ที่เกิดการพลาสโมไลซิส.....	21
3.1	ขั้นตอนการจัดจำแนกสายพันธุ์ยีสต์โดยใช้ชุดทดสอบ API ID 32 C.....	34
4.1	แสดงปริมาณบีตากลูแคน ของยีสต์ 40 สายพันธุ์.....	42
4.2	ลักษณะของโคโลนีของยีสต์บนอาหารแข็งYMและลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของ *Kloeckera apiculata* TISTR5090.....	45
4.3	ลักษณะของโคโลนีของยีสต์บนอาหารแข็งYMและลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของ *Kluyveromyces marxianus* TISTR5116.....	45
4.4	ลักษณะของโคโลนีของยีสต์บนอาหารแข็งYMและลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของ *Debaryomyces hansenii* TISTR5155.....	46
4.5	ลักษณะของโคโลนีของยีสต์บนอาหารแข็งYMและลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของ *Candida parapsilosis* TISTR5904.....	46
4.6	ลักษณะของโคโลนีของยีสต์บนอาหารแข็งYMและลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของ *Candida krusei* TISTR5905.....	47
4.7	น้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ทั้ง 5 ชนิด เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้1% กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน.....	50
4.8	น้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ทั้ง 5 ชนิด เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้ 1% ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน.....	50
4.9	น้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ทั้ง 5 ชนิด เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้ 1% กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน.....	50
4.10	น้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ทั้ง 3 ชนิด เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้ 1% กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน.....	53

รูปที่		หน้า
4.11	น้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ทั้ง 3 ชนิด เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้ 5% กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน.....	53
4.12	น้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ทั้ง 3 ชนิด เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้ 10% กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน.....	53
4.13	น้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ทั้ง 3 ชนิดในอาหารที่มีสัดส่วนของ สารสกัดจากยีสต์ต่อเพพโตนเป็น 0.7% : 0.5% เป็นแหล่งไนโตรเจน.....	56
4.14	น้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ทั้ง 3 ชนิดในอาหารที่มีสัดส่วนของสารสกัดจากยีสต์ต่อเพพโตนเป็น 0.5% : 0.5% เป็นแหล่งไนโตรเจน.....	56
4.15	น้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ทั้ง 3 ชนิดในอาหารที่มีสัดส่วนของสารสกัดจากยีสต์ต่อเพพโตนเป็น 0.4% : 0.5% เป็นแหล่งไนโตรเจน.....	56
4.16	น้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ทั้ง 3 ชนิดในอาหารที่มีสัดส่วนของสารสกัดจากยีสต์ต่อเพพโตนเป็น 0.3% : 0.5% เป็นแหล่งไนโตรเจน.....	56
4.17	น้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ทั้ง 3 ชนิดในอาหารที่มีสัดส่วนของสารสกัดจากยีสต์ต่อเพพโตนเป็น 0.1% : 0.5% เป็นแหล่งไนโตรเจน.....	56
4.18	น้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ทั้ง 3 ชนิด เมื่อใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น 1%.....	59
4.19	น้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ทั้ง 3 ชนิด เมื่อใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น 5%.....	59
4.20	น้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ทั้ง 3 ชนิด เมื่อใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น 10%.....	59
4.21	น้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ทั้ง 3 ชนิดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส.....	62
4.22	น้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ทั้ง 3 ชนิดที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส.....	62
4.23	น้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ทั้ง 3 ชนิดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส.....	62
4.24	น้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ทั้ง 3 ชนิดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส.....	62
4.25	น้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ทั้ง 3 ชนิดเมื่อค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นเป็น 4.5.....	65
4.26	น้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ทั้ง 3 ชนิดเมื่อค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นเป็น 5.0.....	65
4.27	น้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ทั้ง 3 ชนิดเมื่อค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นเป็น 5.5.....	65
4.28	น้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ทั้ง 3 ชนิดเมื่อค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นเป็น 6.0.....	65
4.29	น้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ทั้ง 3 ชนิดเมื่อค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นเป็น 7.0.....	65
4.30	น้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์สายพันธุ์ *D. hansenii* TISTR5155 เมื่อเลี้ยงในถังหมักแบบกะ.....	68
4.31	น้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์สายพันธุ์ *C. parapsilosis* TISTR5904 เมื่อเลี้ยงในถังหมักแบบกะ.....	68

คำย่อ

$Y_{X/S}$ = ผลของเซลล์ที่ได้ต่อหน่วยซับสเตรทที่ใช้ไป

μ = อัตราการเติบโตจำเพาะ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ยีสต์ คือ รากลุ่มหนึ่งที่ส่วนใหญ่มีการดำรงชีวิตเป็นแบบเซลล์เดี่ยว จัดอยู่ในชั้น แอสโคไมซีส (Class Ascomycetes) รูปร่างคล้ายไข่ค่อนข้างกลม ไม่มีสี ส่วนใหญ่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ (budding) ขนาดของเซลล์ขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อมที่พบ แต่โดยทั่วไปแล้ว เซลล์ยีสต์มีความกว้างประมาณ 2.5-10.5 ไมครอน ยาวประมาณ 4.5-21 ไมครอน

ผนังเซลล์ของยีสต์มีส่วนประกอบหลักคือพอลิแซคคาไรด์ซึ่งพบถึง 80-90 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่เหลืออีกประมาณ 3-20 เปอร์เซ็นต์ได้แก่โปรตีน(protein) ลิปิด (lipid) และเกลืออนินทรีย์ (inorganic salt) (Ruiz-Herrera, 1992) ซึ่งพอลิแซคคาไรด์ที่พบบริเวณผนังเซลล์ของยีสต์ ได้แก่ แมนแนน (mannan) กลูแคน (glucan) และไคติน (chitin) ซึ่งองค์ประกอบหลักได้แก่กลูแคนและแมนแนน ส่วนไคตินนั้นพบว่ามีปริมาณเล็กน้อยเท่านั้น (Walker, 1998) อย่างไรก็ตาม องค์ประกอบทางเคมีภายในผนังเซลล์ นั้นจะแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน เนื่องด้วยโครงสร้างของผนังเซลล์นั้นค่อนข้างหนา ผนังเซลล์ชั้นนอกจึงมีหน้าที่เสริมสร้าง ความแข็งแรงให้กับเซลล์ นอกจากจะทำหน้าที่เป็นโครงสร้างให้กับเซลล์แล้ว ผนังเซลล์ยังทำหน้าที่ สำคัญอื่นๆ เช่นกัน เช่นการกำหนดรูปร่างของเซลล์ ซึ่งเป็นเอกลักษณ์ของยีสต์แต่ละสายพันธุ์ โดยเกิดจากการรวมตัวขององค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกันไปในแต่ละสายพันธุ์นั่นเอง นอกจากนี้ผนังเซลล์ชั้นในยังมีบทบาทในกระบวนการทางเอนไซม์หลายๆอย่างที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ เช่นกิจกรรมการย่อยสารอาหารที่นำเข้ามาจากภายนอกเซลล์ หรือกิจกรรมการย่อยสลายองค์ประกอบของผนังเซลล์ในระหว่างขบวนการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (Fleet, 1991) เป็นต้น

บีตากลูแคน (β-glucan) เป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสซึ่งเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิกชนิดบีตา ซึ่งโครงสร้างของบีตากลูแคนนั้นมี β-1,3-glucan เป็นสายหลัก (back bone) ซึ่งพบประมาณ 85 เปอร์เซ็นต์และมี β-1,6-glucan เป็นกิ่ง (branch chain) (Manners และคณะ, 1973) บีตากลูแคนนั้นมีหน้าที่หลักคือสร้างความยืดหยุ่นให้กับผนังเซลล์ ทำให้ผนังเซลล์มีความแข็งแรงและป้องกันการแตกของเซลล์ รวมทั้งทำให้เซลล์สามารถคงรูปร่างอยู่ได้

กระบวนการสังเคราะห์บีตากลูแคนของยีสต์เริ่มต้นในช่วงที่ยีสต์มีการแตกหน่อ เนื่องจากยีสต์จะมีการสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่ โดยจะมีการทำงานของเอนไซม์กลูแคนซินเธเทส (glucan synthetase enzyme) ซึ่งพบกิจกรรมของ เอนไซม์บริเวณพลาสมาเมมเบรน (Shematek และคณะ , 1980)

โดยเริ่มแรกนั้นมีการรายงานว่าสาร Zymosan ที่สกัดได้จากเซลล์ยีสต์นั้นสามารถกระตุ้นกิจกรรมของระบบภูมิคุ้มกันได้ จากนั้น Manner และคณะ (1973) ได้ทำการศึกษาต่อมาพบว่าสาร Zymosan นั้นคือบีตากลูแคน

บีตากลูแคนเริ่มเป็นที่สนใจในการผลิตเนื่องจากสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลากหลายด้าน โดยขึ้นอยู่กับความบริสุทธิ์ของบีตากลูแคน เช่น ใช้เป็นสารให้ความข้นหนืดและใช้เป็นสารทดแทนไขมันในอาหารแคลอรี่ต่ำในอุตสาหกรรมอาหาร (Temeli และ Burkus, 2000 ; Worrasinchai และคณะ, 2005) ทางด้านการแพทย์และเภสัชกรรม สามารถนำมาใช้เป็นสารกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย และยังป้องกันโรคมะเร็งได้อีกด้วย (Hunter และคณะ 2002) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าบีตากลูแคนช่วยลดระดับคลอเรสเตอรอลในเลือด และลดการติดเชื้อหลังผ่าตัดในผู้ป่วยที่ติดเชื้อง่ายได้เช่นกัน (Ross และคณะ 1999) ทางด้านอุตสาหกรรมเครื่องสำอางพบว่า มีการใช้บีตากลูแคนเป็นส่วนผสมในครีมกันแดดและยังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการสร้างคอลลาเจนของผิวหนัง รวมทั้งยังช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันของผิว และลดการทำลายเซลล์ภูมิต้านทานของผิวหนัง (Zulli และคณะ 1996)

จะเห็นว่าบีตากลูแคนมีประโยชน์มากมาย ดังนั้นจึงมีการศึกษาอย่างกว้างขวางเพื่อหาแหล่งผลิตบีตากลูแคนซึ่งสามารถผลิตได้จากหลากหลายแหล่ง เช่น จากธัญพืชต่างๆ ได้แก่ ข้าวโอ๊ต ข้าวบาร์เลย์และจากราและยีสต์

ปัจจุบันการผลิตบีตากลูแคนจากยีสต์มีความสำคัญมากขึ้น เนื่องมาจากยีสต์เป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดี่ยว สามารถควบคุมการเจริญให้อยู่ในภาวะที่ต้องการได้โดยไม่ต้องคำนึงถึงฤดูกาลและสภาพดินฟ้าอากาศในขณะที่การผลิตจากธัญญพืชต้องคำนึงถึงปัจจัยเหล่านี้ อีกทั้งยีสต์ยังมีการใช้วัตถุดิบในการเลี้ยงที่ไม่ยุ่งยาก และสามารถควบคุมการผลิตให้มีผลผลิตสูงในเวลาอันรวดเร็ว

จากเหตุผลที่กล่าวมาจึงมีผู้ทำการศึกษาถึงภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงยีสต์เพื่อทำการผลิตบีตากลูแคนให้ได้ปริมาณสูง ซึ่งส่วนมากจะทำการศึกษาโดยใช้ยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นต้นแบบ แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานพบว่ายีสต์สายพันธุ์ต่างๆจะมีปริมาณบีตากลูแคนที่ต่างกัน (Nguyen และคณะ, 1998 ; Kim และคณะ, 2004) นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของอาหารและภาวะที่ใช้ในการผลิตอีกด้วย

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีความสนใจในการการคัดกรองยีสต์ และการหาภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงยีสต์ซึ่งให้บีตากลูแคนได้ในปริมาณสูงเพื่อนำไปพัฒนาการผลิตในระดับอุตสาหกรรมและนำบีตากลูแคนไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ต่อไป

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

คัดกรองยีสต์ที่มีบีตากลูแคนในปริมาณสูงและศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตบีตากลูแคน

ขั้นตอนงานวิจัย

1. เก็บตัวอย่างและคัดกรองยีสต์
2. วิเคราะห์ปริมาณบีตากลูแคนจากยีสต์ที่คัดเลือกได้
3. ศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตบีตากลูแคน
4. ศึกษาการผลิตบีตากลูแคนในถังหมัก

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ยีสต์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตบีตากลูแคนในปริมาณสูงรวมถึงทราบภาวะที่เหมาะสมในการผลิตบีตากลูแคน ซึ่งจะเป็นข้อมูลเพื่อใช้พัฒนาในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ยีสต์ (Yeast)

ยีสต์ คือ รากลุ่มหนึ่งที่ส่วนใหญ่มีการดำรงชีวิตเป็นแบบเซลล์เดี่ยว จัดอยู่ในชั้น แอสโคไมซีส (Class Ascomycetes) มีรูปร่างหลายแบบ เช่น รูปร่างกลม รี สามเหลี่ยม หรือรูปร่างแบบมะนาวฝรั่ง เป็นต้น ยีสต์มีขนาดใหญ่กว่าแบคทีเรีย คือยาวประมาณ 20 ไมครอน เซลล์ยีสต์มีนิวเคลียส ไม่มีคลอโรฟิลล์ และไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ด้วยตัวเอง บางชนิดมีการสร้างเส้นใยแท้ (true mycelium) บางชนิดสร้างเส้นใยเทียม (pseudo mycelium) ยีสต์ส่วนใหญ่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ (budding) โดยเซลล์ที่อยู่ในสภาวะที่เหมาะสมสามารถแตกหน่อจากหนึ่งเป็นสองเซลล์ได้ภายใน 1-2 ชั่วโมง บางชนิดมีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการสร้างสปอร์ ทั้งชนิดแอสโคสปอร์ (ascospore) และเบสิดิโอสปอร์ (basidiospore) ยีสต์ส่วนใหญ่สามารถเจริญเติบโตได้ดีในช่วงอุณหภูมิที่ 25-40 $^{\circ}$C สามารถทนทานต่อสภาวะความเป็นกรดสูงได้ ถึงค่า pH ที่ 3.5 เจริญได้ดีทั้งในสภาวะ ที่มีและไม่มีอากาศ ซึ่งเป็นขบวนการทางชีวเคมีที่สำคัญต่ออุตสาหกรรมการหมัก (Campbell และ Duffus, 1988) ยีสต์สามารถพบได้ทั่วไปทั้งในดิน น้ำ และอากาศ บางชนิดจะรวมอยู่กับแมลง หรือในกระเพาะของสัตว์บางชนิด แหล่งที่พบมียีสต์มากที่สุดคือแหล่งที่มีปริมาณความเข้มข้น ของน้ำตาลสูง เช่น น้ำผลไม้ น้ำผึ้ง เป็นต้น

การจัดจำแนกประเภทของยีสต์ (Yeast identification)

การจำแนกประเภทของยีสต์จะต้องศึกษาถึงลักษณะทั้งทางด้านสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีประกอบกัน

1. ลักษณะของเซลล์ (Phenotype)

   สังเกตจากรูปร่างว่าเซลล์มีรูปร่างกลม รี หรือรูปร่างไม่แน่นอน สังเกตสี โดยสีที่พบโดยมากคือสีขาว เหลืองอ่อน เหลืองเข้ม สีนวล น้ำตาลอ่อน แดง ชมพู ส้มเป็นต้น สังเกตกลิ่นของเอสเทอร์ และขนาดของเซลล์ที่เจริญบนอาหารเหลว และอาหารแข็ง รวมถึงการสังเกตกลไก การเพิ่มจำนวน การจัดเรียงตัวของเซลล์ ว่าอยู่แบบเซลล์เดี่ยว เป็นคู่ เป็นกลุ่ม หรือ เป็นสาย ศึกษาการสร้างแคปซูล การเกิดตะกอน (flocculant) ว่ามีตะกอนมากน้อยเพียงใด การเกิดฝ้า การเกิดตะกอนของเมือก (mucid sediment) ลักษณะของโคโลนี เช่น เนื้อ (texture) ว่ามีลักษณะเหลว แข็ง หรือหนืด ลักษณะของผิวหน้า (surface) ว่า มีผิวหน้าเรียบ นูน ขรุขระ หรือเป็นคลื่น สังเกตความนูน

(convex) และสังเกตขอบ (margin) ว่าเป็นขอบเรียบ ขอบหยัก หรือขอบเว้า นอกจากนี้ยังต้องสังเกตลักษณะของการสร้างเส้นใยว่ายีสต์ที่ศึกษาว่ามีหรือไม่มี การสร้างทั้งเส้นใยแท้ และเส้นใยเทียม ศึกษาโครงสร้างของผนังเซลล์ และผนังกั้น เส้นใย รวมไปถึงลักษณะการปกคลุมโคโลนีของเส้นใย

2. ลักษณะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ

   สังเกตว่ายีสต์ที่ทำการศึกษามีลักษณะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศวิธีการใดระหว่าง การแตกหน่อ (budding) การแบ่งเซลล์แบบฟิสชั่น (fission) หรือใช้การสร้าง คอนิเดียบนก้าน (stalk) หากเป็นการแตกหน่อ ก็ต้องศึกษาต่อไปว่าเป็นการแตกหน่อแบบ unipolar bipolar multilateral หรือ olive cell (pointed ends)

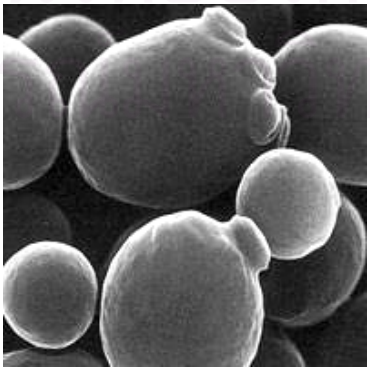
3. ลักษณะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ

   สังเกตว่ายีสต์ที่ทำการศึกษามีการสร้างสปอร์ชนิดแอสโคสปอร์ (ascospore) หรือเบสิดิโอสปอร์ (basidiospore) รวมถึงการสังเกตลักษณะต่างๆของสปอร์ เช่น รูปร่าง สี ขนาด และการจัดเรียงตัว และจำนวนของสปอร์

4. ลักษณะทางชีวเคมี

   สามารถศึกษาการใช้สารอาหาร และการเจริญของยีสต์ที่ทำการศึกษา ด้วยการศึกษาการใช้สารประกอบคาร์บอน โดยการศึกษาการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ ศึกษาการใช้ไนโตรเจน หรือศึกษาจากการเจริญบนอาหาร ที่มีการจำกัดสารอาหารจำพวกวิตามิน รวมถึงการเจริญของยีสต์ที่อุณภูมิต่างๆ และการทำปฏิกิริยากับสีไดอะโซ-เนียม บลู บี (Diazonium Blue B) นอกจากนี้ยังสามารถสังเกตได้จากโครงสร้างของโคเอนไซม์คิว (coenzyme Q) เอนไซม์ยูรีเอส (urease) และการสร้างสารประกอบอมัยลอยด์ (amyloid) อีกด้วย

เมื่อทราบถึงลักษณะต่างๆโดยละเอียดแล้ว จึงนำผลที่ได้ไปเทียบกับ taxonomic key เพื่อระบุว่ายีสต์ที่ทำการศึกษานั้นจัดอยู่ใน genus และ species ใด

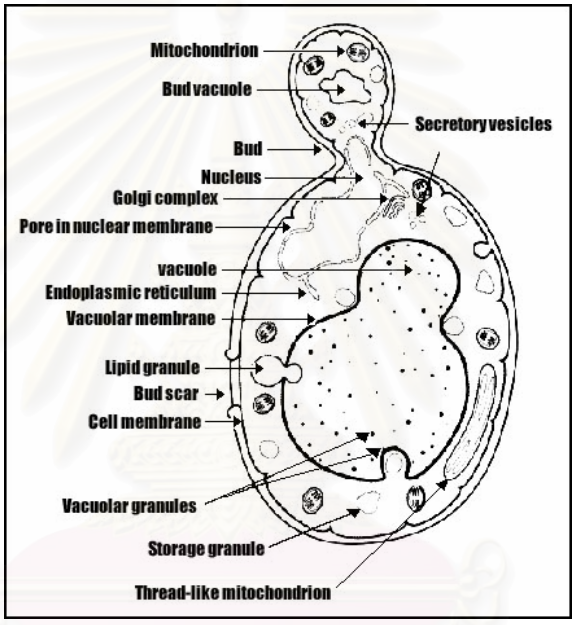


(ที่มา : http://www.wdv.com/CellWorld/Yeast/index_files/image004.jpg)

รูปที่ 2.1 ลักษณะโดยทั่วไปของเซลล์ยีสต์

องค์ประกอบและโครงสร้างของเซลล์ยีสต์

เซลล์ยีสต์มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว รูปร่างคล้ายไข่ค่อนข้างกลม ไม่มีสี ยีสต์ที่กำลังเจริญจะพบมีการแตกหน่อ ขนาดของเซลล์ขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อมที่พบ แต่โดยทั่วไปแล้ว เซลล์ยีสต์มีความกว้างประมาณ 2.5-10.5 ไมครอน ยาวประมาณ 4.5-21 ไมครอน ปริมาตร ประมาณ 40 ลูกบาศก์ไมครอนต่อหนึ่งเซลล์ น้ำหนักแห้งโดยเฉลี่ยประมาณ $1x10^{-10}$ กรัม ภายในเซลล์ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต ที่อยู่ในรูปของกลูแคน และแมนแนน ไนโตรเจนเฉลี่ยประมาณ 7-9% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง โดย 64-79% ของไนโตรเจน พบเป็นองค์ประกอบของโปรตีน โดยโปรตีนจะเชื่อมอยู่กับแมนแนน พิวรีน ไพริมิดีน กรดอะมิโน นิวคลีโอไทด์ ไขมัน วิตามินและสารอินทรีย์ต่างๆ

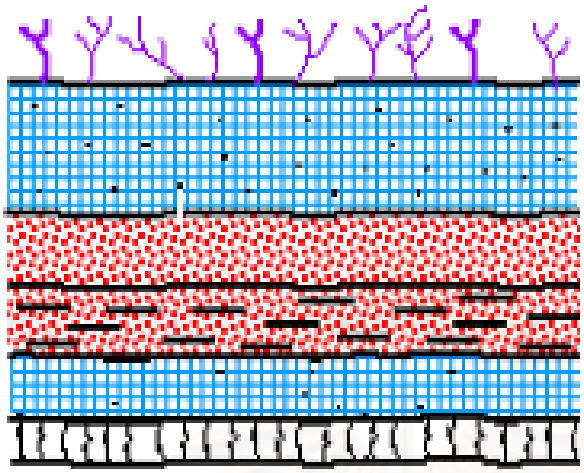


(ที่มา : http://www.bakeinfo.co.nz/school/images/yeast.jpg)

รูปที่ 2.2 แสดงองค์ประกอบโดยรวมของเซลล์ยีสต์

เซลล์ยีสต์สามารถแบ่งได้เป็นสองส่วนหลักๆได้แก่ส่วนของของเหลวภายในเซลล์ รวมถึงนิวเคลียสและไซโตพลาสซึมที่ประกอบไปด้วยโปรตีน ไขมัน วิตามิน แร่ธาตุต่างๆ และกรดนิวคลีอิก กับส่วนของผนังเซลล์ที่ทำหน้าที่ห่อหุ้มของเหลวภายในและทำหน้าที่เป็น โครงสร้างของเซลล์

ผนังเซลล์ของยีสต์(Yeast Cell Wall)



(ที่มา : http://www.imucell.com/imucell/pages/learn-beta.htm)

รูปที่ 2.3 โครงสร้างของผนังเซลล์ของ yeast

โดยทั่วไปสัดส่วนของผนังเซลล์ของยีสต์คิดเป็น 20-30% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง หนาประมาณ 70 นาโนเมตร โครงสร้างของผนังเซลล์มีลักษณะเป็นโครงร่างตาข่าย (sieve like structure) ของสารในกลุ่มพอลิแซคคาไรด์ โดย 55-65% ของน้ำหนักผนังเซลล์ทั้งหมดพบเป็นสารบีตากลูแคน (β-glucan) (Klis และคณะ,2002) บีตากลูแคนเป็นส่วนสำคัญที่มีผลต่อความแข็งแรงและความยืดหยุ่นของผนังเซลล์ของยีสต์ สารอื่นๆที่พบบริเวณผนังเซลล์ได้แก่ แมนแนน (mannan) ไคติน (chitin) ฟอสเฟต (phosphate) และสารพอลิแซคคาไรด์ที่จับอยู่กับสารประกอบอื่นๆ เช่นโปรตีน และไขมัน ซึ่งอยู่ในรูปของไกลโคโปรตีน (glycoprotein) และไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide) โดยสารประกอบเหล่านี้มีปริมาณสูงถึง 80-90% ของน้ำหนักแห้งของ ผนังเซลล์ (Manners และ Masson, 1973) อย่างไรก็ตามองค์ประกอบทางเคมีภายในผนังเซลล์ นั้นจะแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน

เนื่องด้วยโครงสร้างของผนังเซลล์นั้นค่อนข้างหนา ผนังเซลล์ชั้นนอกจึงมีหน้าที่เสริมสร้างความแข็งแรงให้กับเซลล์ นอกจากจะทำหน้าที่เป็นโครงสร้างให้กับเซลล์แล้ว ผนังเซลล์ยังทำหน้าที่สำคัญอื่นๆเช่นกัน เช่นการกำหนดรูปร่างของเซลล์ ซึ่งเป็นเอกลักษณ์ของยีสต์แต่ละสายพันธุ์ โดยเกิดจากการรวมตัวขององค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกันไปในแต่ละสายพันธุ์นั่นเอง นอกจากนี้ผนังเซลล์ชั้นในยังมีบทบาทในกระบวนการทางเอนไซม์หลายๆอย่างที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ เช่น กิจกรรมการย่อยสารอาหารที่นำเข้ามาจากภายนอกเซลล์ หรือกิจกรรม การย่อยสลายองค์ประกอบของผนังเซลล์ในระหว่างขบวนการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (Fleet, 1991) เป็นต้น

องค์ประกอบของผนังเซลล์ชั้นนอกยังมีบทบาทในการยึดติดของเซลล์ ไม่ว่าจะเป็นการ เกาะกลุ่มของเซลล์ยีสต์ด้วยกันเอง (Calleja, 1987) หรือการยึดเกาะกับสิ่งแวดล้อมที่อาศัย อยู่ก็ตาม (Douglas, 1987) กล่าวโดยสรุปแล้วผนังเซลล์มีบทบาทหน้าที่ในการปกป้องเซลล์ คงรูปร่างของเซลล์ ปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์ การรับสัญญาณและสารอาหารเข้าสู่เซลล์ การยึดเกาะ และกิจกรรมสำคัญต่างๆภายในเซลล์ยีสต์นั่นเอง

องค์ประกอบสำคัญของผนังเซลล์ยีสต์ (Yeast cell walll composition)

1. **โพลีแซคคาไรด์** (Polysaccharide) เป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์ของยีสต์ น้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของโพลีแซคคาไรด์ที่พบมากที่สุดก็คือน้ำตาลกลูโคส และพบ กาแลคโตส (Galactose) และแมนโนส (Mannose) ในปริมาณพอสมควร นอกจากนี้ยังมีน้ำตาล อีกหลายชนิดที่พบแตกต่างกันไปตามแต่ละสายพันธุ์ของยีสต์ เช่น แรมโนส (Rhamnose) ไซโลส (Xylose) อะราบิโนส (Arabinose) ฟิวโคส (Fucose) และไรโบส (Ribose) เป็นต้น

โพลีแซคคาไรด์ชนิดที่พบมากในผนังเซลล์ยีสต์ได้แก่ ไคติน (Chitin) ซึ่งเป็นสายโพลี- แซคคาไรด์ที่ไม่มีการแตกแขนง เกิดจากการรวมตัวเข้าด้วยกันของ *N-acetylglucosamine* (GlcNAc) ด้วยพันธะ β-1,4 ยีสต์ที่มีสัดส่วนของไคตินในผนังเซลล์สูงได้แก่ยีสต์สายพันธุ์ *Apodachlya sp.* และ *Leptomitus lacteus*

กลูแคน (Glucan) เป็นโพลีแซคคาไรด์อีกชนิดหนึ่งซึ่งสามารถพบได้มากกว่าไคติน กลูแคนที่พบมากในผนังเซลล์ของยีสต์คือ บีตากลูแคน (β-glucan) มีการเชื่อมต่อ (linkage) สามแบบหลักๆประกอบไปด้วย แบบ β-1,3 แบบ β-1,6 และแบบ α -1,3 ซึ่งทั้งสามแบบนี้ สามารถพบได้ในสัดส่วนที่แตกต่างกันไปในยีสต์แต่ละชนิด

แมนแนน (Mannan) พบได้มากบริเวณพื้นผิวชั้นบนของผนังเซลล์ โดยแมนแนนเป็น พอลิเมอร์ของน้ำตาลแมนโนส โดยสายพอลิเมอร์หลักของน้ำตาลแมนโนสนี้จะเชื่อมต่อกันด้วย พันธะ α -1,4 glycosidic linkage ของคาร์บอนอะตอมในสายโมเลกุล ขณะที่ สายรอง (side chain) จะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α -1,2 glycosidic linkage และ α -1,3 glycosidic linkage แมนแนนจะเชื่อมต่อกับโปรตีนโดยพันธะไฮโดรเจนระหว่างแอสพาราจีน (asparagine) กับ N-acetylglucosamine นอกจากนี้ยังมีการพบแมนแนนเชื่อมต่ออยู่กับฟอสเฟตโดยผ่านกระบวนการฟอสโฟรีเลชัน (phosphorylation)

นอกจากนี้ยังสามารถพบไคโตซาน (Chitosan) โพลีกาแลคโตซามิโนไกลแคน (polygalactosaminoglycan) ไนจีแรน (Nigeran) และโพลีแซคคาไรด์อีกหลายชนิดบนผนังเซลล์ของยีสต์ได้ ซึ่งจะพบได้แตกต่างกันไปตามแต่ยีสต์แต่และสายพันธุ์ และแต่ละช่วงของการเจริญของเซลล์นอกจากโพลีแซคคาไรด์แล้วยังสามารถพบเฮทเทอโรโพลีแซคคาไรด์ (Heteropolysaccharide) บนผนังเซลล์ของยีสต์บางชนิดอีกด้วย เช่น มิวโคแรน (Mucoran) และไกลคูโรแนน (Glycuronan) เป็นต้น

ตารางที่ 2.1 โพลีแซคคาไรด์ชนิดต่างๆที่พบที่ผนังเซลล์ของพวก fungi (Ruiz-Herrera J., 1992)

Polymer	Monomer	Linkage and structure
Chitin	N-acetylglucosamine	β-1,4-long unbranched polymer
Chitosan	D-glucosamine	β-1,4-long unbranched polymer
Cellulose	D-glucose	β-1,4-long unbranched polymer
β-Glucan	D-glucose	β-1,3-linked backbone with β-1,6-link at branch points
α-Glucan	D-glucose	α-1,3-and α-1,4
Mannan	D-mannose	α-1,6-linked backbone with frequence α-1,2-and α-1,3-linked branches of one to five residues each

2. **โปรตีน** (Protein) โดยทั่วไปแล้วจัดว่ามีปริมาณค่อนข้างน้อยในผนังเซลล์ของยีสต์ คือประมาณ 3-20% ของน้ำหนักแห้งของผนังเซลล์ การศึกษาในช่วงแรกไม่พบว่าโปรตีน ในผนังเซลล์ (Cell Wall Protein:CWPs) นี้มีบทบาทที่สำคัญใดๆที่แตกต่างไปจากโปรตีน ที่อยู่ภายในเซลล์ เป็นเหตุให้มีการถกเถียงกันว่าโปรตีนนั้นจริงๆแล้วเป็นองค์ประกอบของผนัง เซลล์ที่แท้จริงหรือไม่ แต่ด้วยการศึกษาหลายๆชิ้นนำมาซึ่งหลักฐานหลายประการเช่นกัน ที่สนับสนุนว่าโปรตีนนั้นเป็นองค์ประกอบที่แท้จริง โดยโปรตีนส่วนใหญ่ที่พบบนผนังเซลล์ ของยีสต์นั้นอยู่ในรูปของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างโพลีแซคคาไรด์กับโปรตีน (Polysaccharide and Protein Complex) เช่น กลูแคนโปรตีน กลูโคแมนแนนโปรตีน และแมนโนโปรตีน เป็นต้น โดยโปรตีนที่อยู่บนผนังเซลล์นั้นมีการจำแนกไว้ 2 ชนิดคือ

2.1 Glycosyl Phophatidylinositol (GPI) – dependent cell wall protein (GPI-CWPs) โมเลกุลของโปรตีนกลุ่มนี้จะเชื่อมต่ออยู่กับส่วนปลายของ β-1,3-glucan โดยผ่าน β-1,6-glucan ด้วยพันธะโควาเลนต์ ส่วนภายในโครงสร้างจะมีกรดอะมิโนซีรีน และทรีโอนีน ที่เรียงตัวซ้ำๆกัน

2.2 Protein with Internal Repeat (Pir) Protein (Pir-CWPs) โมเลกุลของโปรตีนกลุ่มนี้จะเชื่อมต่ออยู่กับส่วนปลายของ β-1,3-glucan ด้วยพันธะ O-linked side chain ซึ่งเป็นพันธะที่สามารถทำลายได้ง่ายโดยใช้เบสอ่อน

นอกจากนี้ แมนโนโปรตีนบนผนังเซลล์ยังมีคุณสมบัติพิเศษที่สามารถจะจับกับแบคทีเรียได้ โดยมีการศึกษาการนำไปใช้ยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคท้องร่วงในสัตว์ (*E.coli* และ *Salmonella spp.)* พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโต และการเพิ่มจำนวนในระบบทางเดิน อาหารของสัตว์ได้ (สำนักนวัตกรรมแห่งชาติ, 2549)

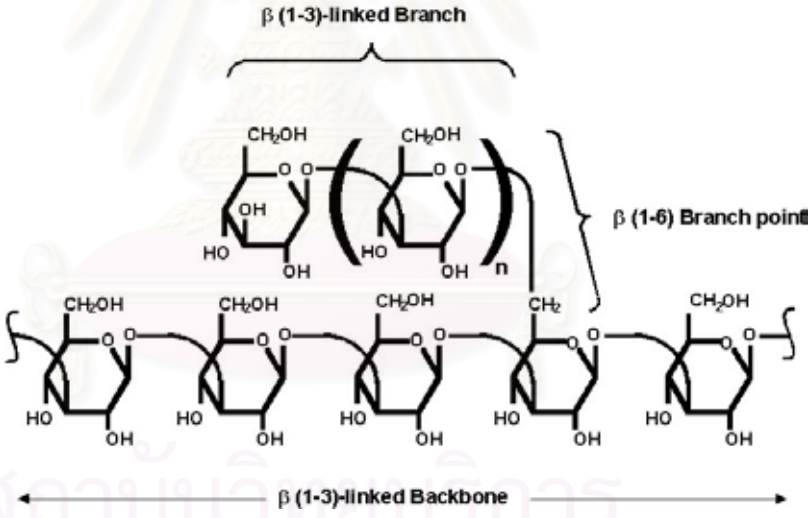
3. ลิปิด (Lipid) เป็นองค์ประกอบย่อยอีกตัวหนึ่งของผนังเซลล์ของยีสต์ ความเข้มข้นของลิปิดจะแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ของยีสต์ โดยเฉลี่ยแล้วอยู่ในช่วง 1-10% ของน้ำหนักแห้งของผนังเซลล์ ลิปิดบนผนังเซลล์นั้นมีทั้งแบบที่อยู่อย่างอิสระ (free or readily extracted) และแบบที่จับอยู่กับโมเลกุลอื่นอยู่ (bound lipid) โดยลิปิดแบบหลังนั้น มีปริมาณมากกว่าแบบแรกประมาณ 2-3 เท่า ลิปิดบนผนังเซลล์มีบทบาทในการเสริมสร้าง ความแข็งแรงของผนังเซลล์ และป้องกันไม่ให้ผนังเซลล์แห้งลง (Shah และ Knight, 1978)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บีตากลูแคน (β-glucan)

บีตากลูแคนเป็นพอลีแซคคาไรด์ที่ร่างกายมนุษย์ไม่สามารถย่อยได้ สามารถพบได้ทั้งในเมล็ดธัญพืช เช่นข้าวบาร์เลย์ ข้าวโอ๊ต พบได้ในแบคทีเรีย สาหร่าย เห็ด และยีสต์ โดยการผลิตบีตากลูแคนที่ได้รับความ นิยมสูงสุดคือการผลิตบีตากลูแคนจากยีสต์ เนื่องจากยีสต์เป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดี่ยว สามารถทำการ เลี้ยงให้อยู่ในสภาวะที่ต้องการได้ ใช้วัตถุดิบในการเลี้ยงที่ไม่ซับซ้อน และสามารถควบคุมการผลิต ให้มีผลผลิตสูงได้ในเวลาอันสั้น

บีตากลูแคนที่พบบนผนังเซลล์ของยีสต์นั้นประกอบไปด้วยสายโครงหลักและสายรอง ภายในสายหลักเป็นกลูโคสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-1,3 ซึ่งสายรองจะแตกแขนงจากสายหลักที่ตำแหน่งพันธะ β-1,6 (Kapteyn *et al*., 1996) ดังแสดงในรูปที่ 2.4 โดย β-1,3-glucan ส่วนใหญ่จะอยู่บริเวณผนังเซลล์ชั้นในและ β-1,3-glucan ที่มีการแตกแขนงจะพบมากที่ผนังเซลล์ ชั้นกลาง โดยบีตากลูแคนทำหน้าที่เสริมสร้างความแข็งแรง ให้กับผนังเซลล์ของยีสต์นั่นเอง



(ที่มา : www.9.onc.ne.jp/~immunet/e11.html)

รูปที่ 2.4 โครงสร้าง β-(1,3)/(1,6)-D-glucan

ประโยชน์ของบีตากลูแคน

เนื่องจากมีการศึกษาพบคุณสมบัติของบีตากลูแคนในการกระตุ้นและเสริมสร้างภูมิคุ้มกันในสิ่งมีชีวิต (Riggi และ Di Luzio, 1961) จึงทำให้มีความสนใจถึงการใช้ประโยชน์จากบีตา- กลูแคนที่สกัดได้จากผนังเซลล์ ของยีสต์กันอย่างกว้างขวาง

การศึกษาหลายชิ้นที่สนับสนุนว่าบีตากลูแคนมีส่วนสนับสนุนการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันได้ เช่นการศึกษาของ Kogan และคณะ (1989) ที่พบว่าเบเกอร์ยีสต์ที่ผ่านขบวนการ carboxymethylation และ sulfoethylation สามารถต่อต้านการติดเชื้อแบคทีเรีย *Klebsiella pnuemoniae* ในหนูได้ และจากการศึกษาเพิ่มเติมโดย Chorvatovicova และคณะ (1993) พบว่ากลูแคนที่ผ่านขบวนการ sulfoethylation จะมีความสามารถในการต่อต้านการเกิดมะเร็งในหนู ที่ทำการทดสอบด้วยการใช้โปแตสเซียมไบโครเมต (potassium bichromate) ซึ่งเกิดจากการที่ อิออนของ Cr^{VI} ไปจับกับหมู่ sulfoethyl ในกลูแคน นอกจากนี้ Vereschagin และคณะ (1994) ยังพบว่าบีตากลูแคนที่ผ่านขบวนการ carboxymethylation ยังสามารถป้องกัน การเกิดลิ่มเลือดในหนูได้อีกด้วย นอกจากสองขบวนการข้างต้นจะช่วยเพิ่มความสามารถ และประสิทธิภาพในการทำงานของบีตากลูแคนแล้ว ตัวบีตากลูแคนที่จับอยู่กับไคตินเองก็ยังมี ความสามารถในการต่อต้านการเกิดมะเร็งได้เช่นกัน (Chorvatovicova และคณะ, 1993)

Pelizon และคณะ (2004) ได้ทำการศึกษาการให้บีตากลูแคนที่ได้มาจาก *S.cerevisiae* 100 มิลลิกรัมในหนู พบว่ามีเซลล์หนูมีการผลิต IL-12p40, IL-12p70 และ TNF-α ได้สูงขึ้น และเมื่อทำการกระตุ้นด้วย *Streptococcus aureus* พบว่าหนูที่ได้รับบีตากลูแคนมีกิจกรรมของ NK cell ที่สูงกว่าหนูที่ไม่ได้รับบีตากลูแคน นอกจากนี้หนูที่ได้รับบีตากลูแคนยังสามารถยับยั้ง การเจริญของ *Paracoccidioides brasiliensis* ได้ดีกว่าหนูที่ไม่ได้รับบีตากลูแคนอีกด้วย

การทดลองการฉีดกลูแคนให้กับปลาแซลมอนของ Robertsen และคณะ (1990) พบว่าปลาแซลมอนที่ทำการทดลองมีความต้านทานต่อเชื้อ *Yersinia rukeri* เชื้อ *Vibrio anguillarum* และเชื้อ *Vibrio salmonicida* สูงขึ้น ซึ่งเชื้อเหล่านี้เป็นสาเหตุของโรค red mouth โรค vibriosis และโรค hitra ตามลำดับ โดยปลาที่ทำการทดลองจะมีภูมิต้านทานต่อเชื้อเหล่านี้สูงสุด หลังจากทำการฉีดกลูแคนเข้าไปเป็นเวลา 3 สัปดาห์ จากการศึกษาถัดมาของ Engstad และคณะ (1992) พบว่าระยะเวลาที่ผ่านไป 3 สัปดาห์หลังจากทำการฉีดกลูแคนเข้าไปนั้น กิจกรรมของเอนไซม์ ไลโซไซม์ (lysozyme) ในปลาแซลมอนจะสูงขึ้น รวมไปถึงกิจกรรมของคอมพลีเมนต์ (complement) ที่สูงขึ้นเช่นกันเมื่อเวลาผ่านไป 2-4 สัปดาห์

จากการทดลองของ Williams และคณะ (1996) พบว่าบีตากลูแคนสามารถช่วยยับยั้งการเกิดเนื้องอก การบวม และการทำงานของสารก่อมะเร็งได้ และยังพบอีกว่าบีตากลูแคนสามารถช่วยยืดระยะเวลาการมีชีวิตในสัตว์ที่ผ่านการปลูกถ่ายเซลล์เมลาโนมา (melanoma) เซลล์อะดีโนคาซิโนมา (adenocarcinoma) เซลล์แมมารีคาซิโนมา (mammary carcinoma) และเซลล์ลิมโฟไซติก ลูคีเมีย (lymphocytic leukemia)

นอกจากการทดลองในสัตว์แล้ว ก็มีการทดลองการนำบีตากลูแคนมาใช้ในมนุษย์เช่นกัน ตัวอย่างเช่นการศึกษาของ Babineau และคณะ (1994) ที่ทำการดัดแปลงพันธุกรรมของยีสต์ เพื่อปรับปรุงบีตากลูแคน พบว่าบีตากลูแคนที่ผ่านการปรับปรุงนั้นสามารถจับกับโมโนไซต์ (monocyte) และนิวโทรฟิล (neutrophil) ได้มากขึ้น ซึ่งเมื่อนำบีตากลูแคนนี้ไปประยุกต์ใช้ในผู้ป่วยที่เข้ารับการผ่าตัดพบว่า หลังการผ่าตัดนั้นผู้ป่วยต้องการการใช้ยาปฏิชีวนะลดลง และใช้เวลาในการพักฟื้นสั้นลงอีกด้วย นอกจากนี้ Hofer และคณะ (1995) ยังพบว่าในบางครั้ง บีตากลูแคนยังมีบทบาทเป็นสารป้องกัน รังสี (radioprotective) ซึ่งจะมีประโยชน์ต่อผู้ป่วย ที่มีความจำเป็นต้องทำการฉายรังสีเป็นประจำ

บีตากลูแคนยังมีประโยชน์ในด้านการบำรุงผิวพรรณโดยจากการศึกษาของ Williams และคณะ (1996) พบว่าบีตากลูแคนสามารถกระตุ้นการทำงานของมาโครฟาจก์ใน langerhans cell ได้ ซึ่งเป็นผลให้ผิวหนังมีความยืดหยุ่น ไม่แตกแห้ง ด้วยการค้นพบนี้ จึงทำให้อุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์เสริมความงามเกิดความสนใจและตื่นตัวในการนำบีตากลูแคนมาเป็นส่วนผสม จากการทดลองใช้จริงในอาสาสมัครสตรีที่มีอายุระหว่าง 35-60 ปี จำนวน 150 คน พบว่าผู้ใช้ ส่วนใหญ่มีรอยเหี่ยวย่นลดลงมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับผู้ที่ไม่ได้ใช้ผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสม ของบีตากลูแคน นอกจากนี้ผิวหนังยังมีความยืดหยุ่นและชุ่มชื้นขึ้นอีกด้วย

นอกจากนี้ยังพบว่าบีตากลูแคนจากยีสต์สามารถช่วยลดระดับคอเลสเตอรอล (cholesterol) โดยรวมได้ จากการศึกษาของ Nicolosi และคณะ, 1999 พบว่าเมื่อผู้ป่วยที่มี ระดับคอเลสเตอรอลในกระแสเลือดสูง ได้รับเส้นใยบีตากลูแคนวันละ 15 กรัม เป็นเวลา 8 สัปดาห์ จะสามารถลดระดับคอเลสเตอรอลรวมได้ โดยคอเลสเตอรอลชนิด LCL (low density lipoprotein) จะลดลง ขณะที่คอเลสเตอรอลชนิด HDL (high density lipoprotein) จะเพิ่มขึ้น สันนิษฐานว่าเกิดจากการที่บีตากลูแคนไปช่วยสนับสนุนให้เกิดการหลั่งกรดน้ำดีขึ้นมานั่นเอง

นอกจากนี้ Kerckhoffs และคณะ (2004) ได้ทำการศึกษาให้กลุ่มตัวอย่างบริโภคน้ำส้มที่มีส่วนผสมของบีตากลูแคนเป็นเวลา 2 สัปดาห์ รวมปริมาณบีตากลูแคนที่บริโภค เข้าไปทั้งหมด 0.5 กรัม พบว่าสามารถลดปริมาณคอเลสเตอรอลทั้งหมดในเลือดได้ถึง 85 มิลลิกรัมต่อลิตร

บีตากลูแคนช่วยส่งเสริมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันโดยการเข้าไปจับกับเซลล์หลายๆ ชนิดในระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (non specific immune system) เช่น มาโครฟาจก์ และนิวโทรฟิล โดยจับกันตรงตำแหน่งรับบีตากลูแคน (β-glucan receptor) ซึ่งพบว่ามาโครฟาจก์สามารถจับกับบีตากลูแคนได้ดีกว่าเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันตัวอื่นๆ (Lee และคณะ, 2001) และเมื่อเซลล์ภูมิคุ้มกันได้จับกับบีตากลูแคนแล้วเซลล์เหล่านั้นจะถูกกระตุ้นให้เกิดการสร้างสารประกอบต่างๆเพื่อต่อต้านสิ่งแปลกปลอม

ความสามารถในการกระตุ้นข้างต้นนั้นเกิดจากการที่บีตากลูแคนมีโครงสร้างเป็นแขนง โดยบีตากลูแคนที่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดีควรมีค่า degree of polarization อยู่ระหว่าง 0.2 ถึง 0.3 ซึ่งแสดงว่าบีตากลูแคนนั้นมีโครงสร้างแบบเกลียวแบบ triple helix และหมู่ hydrophilic group ที่ผิวนอกของเกลียวยังจะช่วยเพิ่มความสามารถในการกระตุ้น ระบบภูมิคุ้มกันได้อีกด้วย (Bohn และ BeMiller, 1995)

นอกจากประโยชน์ทางด้านการแพทย์แล้ว ด้วยคุณสมบัติอื่นๆของบีตากลูแคน ทำให้มีการนำไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์อีกในหลายด้าน เช่น คุณสมบัติของบีตากลูแคนที่ไม่ละลายน้ำที่อุณหภูมิห้อง แต่มีคุณสมบัติที่สามารถอุ้มน้ำและทำให้เกิดความหนืดกับสารละลาย รวมถึงความสามารถในการดูดซับน้ำมัน จึงทำให้มีการนำบีตากลูแคนมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น ใช้เป็นสารที่ทำให้เกิดความคงตัวในระบบอิมัลชัน (emulsion stability) ซึ่งช่วยในการลดแรง ตึงผิวระหว่างอนุภาคน้ำกับน้ำมัน ตลอดจนใช้เป็นสารให้ความหนืด เป็นต้น (Kollar และคณะ, 1992) ตัวอย่างการนำไปใช้เช่นการนำบีตากลูแคนไปใช้ในผลิตภัณฑ์มายองเนสเพื่อทดแทนไขมัน (fat replacer) (Worrasinchai และคณะ, 2005)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แหล่งของบีตากลูแคน

บีตากลูแคนนั้นนอกจากสามารถพบได้ที่ผนังเซลล์ของยีสต์แล้วยังสามารถพบได้จากแหล่งอื่นๆในธรรมชาติได้อีกด้วย ซึ่งแหล่งของบีตากลูแคนที่มีผู้เคยทำการศึกษาได้แก่

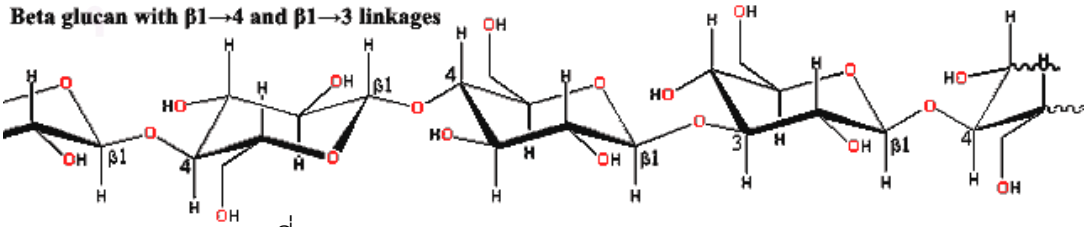
Beta Glucan Type	Structure	Description
Bacterial		Linear β1,3-glucan (Curdland)
Fungal		Short β1,6-glucan branched β1,3-glucan (*i.e.* Schizophyllan)
Yeast		Long β1,6-glucan branched β1,3-glucan (WGP Beta Glucan, Betafectin™)
Cereal		Linear β1,3/β 1,4-glucan (*i.e.* oats, barley, rye)

(ที่มา : http://www.imucell.com/imucell/pages/learn-beta.htm)

รูปที่ 2.5 แสดงรูปแบบของบีตากลูแคนในแหล่งต่างๆ

บีตากลูแคนในเมล็ดธัญพืช (Cereal β-glucan)

บีตากลูแคนที่พบในเมล็ดธัญพืช เช่น ข้าวบาร์เลย์ ข้าวโอ๊ต ข้าวไรน์ และข้าวสาลี ส่วนมาก จะเป็นบีตากลูแคนสายตรงของ β-1,3-glucan และ β-1,4-glucan อยู่ปะปนกันในผนังเซลล์ของเอนโดเสปิร์มของเมล็ดธัญพืชข้างต้น เมื่อทำการสกัดบีตากลูแคน จากข้าวโอ๊ตพบว่า มีบีตากลูแคนสายตรงที่ประกอบด้วย 4-O-linked β-D –glucopyranosyl unit ประมาณ 70% และ 3-O-linked β-D –glucopyranosyl unit ประมาณ 30% โดย β-1,3-glucan โดยมากจะพบอยู่เดี่ยวๆ ขณะที่ β-1,4-glucan มักพบเป็นกลุ่ม (Ren *et al.*, 2003) โดยปกติบีตากลูแคนที่พบในธัญพืชส่วนมาก มีลักษณะเป็นเกลียวสุ่ม (random coil)



(ที่มา : http://www.lsbu.ac.uk/water/hygly.html)

รูปที่ 2.6 โครงสร้างของ β-(1,3),(1,4)-D-glucan ซึ่งพบในเมล็ดธัญพืช

บีตากลูแคนในสาหร่าย

พบ β-glucan ในรูปแบบของแหล่งกักเก็บพลังงานที่เรียกว่า Laminarin โดยสาหร่ายจะผลิต Laminarin ออกมาโดยขบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง ซึ่ง Laminarin นี้ก็คือ hydrophilic β-1,3-glucan (รูปที่5) นั่นเอง Laminarin นี้เป็นแหล่งอาหาร สำหรับสัตว์ทะเล หลายชนิด และรวมไปถึงมนุษย์ที่นำเอาสาหร่ายนั้นมาปรุงอาหารด้วย

Laminarin มีประโยชน์มากมาย เช่น นำไปใช้ในการผลิตสบู่ และแก้ว, ใช้เป็น thickener ในอุตสาหกรรมไอศกรีม เจลลี่ และยาสีฟัน และเมื่อใช้ Laminarin กับพืชพวกยาสูบ พบว่าสามารถป้องกันแบคทีเรียก่อโรคได้อีกด้วย

(ที่มา : www.immunocrop.com/beta-glucan/bio_reserch.cfm)

รูปที่ 2.7 โครงสร้างของ laminarin ที่พบในพวกสาหร่าย

บีตากลูแคนในแบคทีเรีย

บีตากลูแคนที่พบในแบคทีเรียมีชื่อเรียกอีกอย่างหนึ่งว่าเคิร์ดแลน (Curdlan) เป็นเอกโซ-พอลีแซคคาไรด์สายตรงของ β-1,3-glucan ไม่มีแขนง มีค่า degree of polymerization ประมาณ 450 เคิร์ดแลนเป็นบีตากลูแคนที่มีความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของมนุษย์ได้

บีตากลูแคนในยีสต์

บีตากลูแคนในยีสต์พบได้ในยีสต์ทั่วไป โดยเป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์ยีสต์ โดยทั่วไปแล้วบีตากลูแคนในผนังเซลล์ของยีสต์มีอยู่สามแบบหลักๆคือ

β-1,3-glucan จัดเป็นโครงสร้างหลักของบีตากลูแคน มีค่า degree of polymerization ประมาณ 1,500 มีมวลโมเลกุลเฉลี่ย 240,000 เส้นใยที่พบยาวที่สุดประมาณ 600 นาโนเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10-30 นาโนเมตร มีลักษณะทั้งแบบที่เป็นเส้นใย (fibrous) แบบที่ ไม่มีรูปร่างแน่นอน (amorphous) และแบบเกลียว (helical conformation) โดยเกลียวนั้นอาจประกอบด้วยพอลีแซคคาไรด์สายเดี่ยว หรือสายที่มี พันธะไฮโดรเจน 3 พันธะก็ได้ ซึ่งแบบหลัง จะทำให้เกิดโครงสร้างที่เรียกว่าทริปเปิลเฮลิกซ์ (triple helix) การแตกแขนงออกจากบีตากลูแคนสายหลักนั้นจะเกิดขึ้นที่ตำแหน่งหมู่ไฮดรอกซีที่ 6 (6-hydroxy group) ซึ่งการแตกแขนงออกมานี้จะไม่ส่งผลต่อการบิดเป็นเกลียวของบีตากลูแคน แต่หากสายรองที่แตกแขนงออกมามีความยาวมาก ก็อาจเป็นสาเหตุให้เกิดเป็นโครงข่ายเส้นใย และหากสายรองมีความยาวไม่มาก ก็อาจเป็นสนับสนุนให้เกิดโครงสร้างแบบเกลียวแบบ triple helix (Saito, 1991)

β-1,6-glucan พบรวมอยู่กับ β-1,3-glucan มีประมาณ 5% ของน้ำหนักแห้งของ ผนังเซลล์ เป็นบีตากลูแคนที่มีโครงสร้างลักษณะเป็นแขนง ทำหน้าที่เชื่อมแต่ละองค์ประกอบ ในผนังเซลล์ (Koller *et al*., 1997) เช่นการเชื่อมต่อระหว่าง GPI-dependent cell wall protein กับ β-1,3-glucan เป็นต้น เซลล์ยีสต์ที่ขาดความสามารถในการสร้าง β-1,6-glucan จะขาดการประกอบกันขององค์ประกอบต่างๆให้กลายเป็นผนังเซลล์ ทำให้มีผลกระทบอย่างรุนแรงต่อการเจริญของเซลล์

α -1,3-glucan ในยีสต์ทั่วๆไปจะพบบีตากลูแคนรูปแบบนี้ในสัดส่วนที่น้อยกว่าบีตา -กลูแคนสองแบบแรก อย่างไรก็ตามพบว่ายีสต์ที่เป็นอันตรายหรือเป็นยีสต์ที่สามารถก่อโรคได้ เช่น *Cryptococcus* และ *Blastomyces dermatitidis* นั้นจะมีสัดส่วนของ α -1,3-glucan อยู่สูงกว่ายีสต์ที่ไม่ได้เป็นยีสต์ก่อโรค มีการศึกษานำยีสต์ก่อโรค *Paracoccidioides brasiliensis* มาทำการเลี้ยงในหลอดทดลองไประยะหนึ่งพบว่าปริมาณของ α -1,3-glucan บนผนังเซลล์นั้นมีการลดลงจาก 45% เหลือเพียง 3% เท่านั้น

การสังเคราะห์บีตากลูแคนของยีสต์

กระบวนการสังเคราะห์บีตากลูแคนของยีสต์เริ่มต้นในช่วงที่ยีสต์มีการแตกหน่อ เนื่องจากยีสต์จะมีการสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่ โดยจะมีการทำงานของเอนไซม์กลูแคนซินเธเทส (glucan synthetase enzyme) ซึ่งพบกิจกรรมของ เอนไซม์บริเวณพลาสมาเมมเบรน (Shematek *et al*., 1980) การสร้างผนังเซลล์ของยีสต์เริ่มด้วยการสร้าง β-1,3-glucan โดยมีโปรตีน Fks1p/Fks2p และ Rho1p เข้ามาช่วยในการควบคุมการสังเคราะห์ สำหรับ β-1,6-glucan นั้นอาจสังเคราะห์ขึ้นมาได้จากการใช้ β-1,3-glucan เป็นตัวตั้งต้น หรืออาจมีการสร้างจากบริเวณอื่น แล้วจึงมีการขนส่งมาเชื่อมต่อเข้ากับ β-1,3-glucan อีกทีหนึ่ง แล้วจึงมีแมนโนโปรตีน และไคติน ตามเข้ามาเชื่อมต่อด้วยตามลำดับ (Roh *et al*., 2002)

โปรตีนที่ได้กล่าวไปข้างต้น เช่น Rho1p หรือ GTP-binding protein มีการสร้างมาจากยีน *RHO1* นั้นทำงานโดยการเข้าไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์บีตา 1,3 กลูแคนซินเธเทส (Beta 1,3 glucan synthetase) อย่างไรก็ดีเอนไซม์ที่มีบทบาทในการสังเคราะห์ บีตากลูแคนนั้นไม่ได้ ทำงานเพียงแค่ตัวเดียว แต่เป็นการทำงานร่วมกันของเอนไซม์หลายๆตัว จากการทดลอง ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของยีน *KRE6* ที่มีความสำคัญต่อการสร้างทั้ง β-1,3-glucan และ β-1,6-glucan กลับพบว่ายีสต์ยังสามารถสร้างบีตากลูแคนได้อยู่ ถึงแม้จะมีประสิทธิภาพลดลงก็ตาม (Roemer *et al*., 1994) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาโดยการทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของยีน *FKS1* และ *FKS2* ซึ่งเป็นยีนสำคัญในการสร้าง β-1,3-glucan อีกชุดหนึ่ง พบว่าเมื่อไม่มีการทำงานของ Fks1p และ Fks2p พบว่าเซลล์ผลิต β-1,3-glucan ได้ลดลง และเป็นผลให้เซลล์ไม่อาจเจริญได้ (Mazur และ Baginsky, 1996)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างบีตากลูแคน

บีตากลูแคนเป็นองค์ประกอบที่สำคัญในผนังเซลล์ของยีสต์ซึ่งจะเกิดการสร้างเมื่อเซลล์มีการแบ่งตัว ดังนั้นหากต้องการผลิตบีตากลูแคนให้มีปริมาณมากจึงสามารถทำได้โดยเพิ่มจำนวนเซลล์ยีสต์ให้มีปริมาณมากๆซึ่งปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการเจริญของยีสต์แบ่งได้เป็น 4 ปัจจัยหลัก ได้แก่

1. แหล่งอาหาร โดยแหล่งอาหารหลักๆที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ ได้แก่ แหล่งคาร์บอน ซึ่งยีสต์นำสารประกอบคาร์บอนที่ได้ไปใช้ในการสร้างพลังงานให้กับเซลล์ โดยผ่านวิถีไกลโคไลซิส (glycolytic pathway) และวัฏจักรเครบส์ (Kreb's cycle) โดยพลังงาน ที่ได้จะถูกนำไปใช้ในกิจกรรมการเจริญและการเพิ่มจำนวน สารประกอบคาร์บอนที่ยีสต์สามารถ นำมาใช้ได้ดีได้แก่ น้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส แมนโนส และซูโครส นอกจากนี้ยีสต์ยังสามารถใช้ กรดแลคติก กรดทาร์ทาริค กรดซัคซินิค กรดอะซิติก กรดไกลโคลิค รวมถึงเอทานอลเป็นแหล่ง คาร์บอนได้อีกด้วย (Burrows, 1970) แหล่งไนโตรเจน โดยยีสต์จะนำไนโตรเจนที่ได้จากอาหาร ไปใช้โดยการเปลี่ยนให้เป็นกรดอะมิโน กรดนิวคลีอิค โปรตีน และองค์ประกอบอื่นๆ ธาตุอาหาร อื่นๆเช่น ฟอสฟอรัส โดยยีสต์ใช้ฟอสฟอรัสในการสร้างพลังงาน สังเคราะห์สารจำพวกนิวคลีโอ- โปรตีน และสารประกอบอื่นๆ รวมถึงช่วยในการรักษาค่าความเป็นกรด-ด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Rose และ Harrison, 1970) นอกจากนี้ยีสต์ยังนำซัลเฟอร์จากอาหารเข้าไปใช้ในกระบวนการที่ เกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์เพอร์มิเอส (permease) (Jones, Pamment และ Greenfield, 1981) ธาตุอาหารที่สำคัญยังรวม ไปถึงวิตามิน ซึ่งช่วยในการควบคุมเมตาบอลิสมของยีสต์ โดยวิตามินเป็นสารตั้งต้นที่สำคัญในการทำงานของเอนไซม์ (Jones และคณะ, 1981)

2. ออกซิเจน การให้ออกซิเจนจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ เนื่องจากกระบวนการสร้างพลังงานในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนของยีสต์นั้นจะมีการสร้างเอธานอลออกมา เป็นผลให้ การเจริญของยีสต์เป็นไปอย่างไม่มีประสิทธิภาพ

3. อุณหภูมิ โดยปกติแล้วยีสต์แต่ละสายพันธุ์ก็จะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ทำให้เซลล์สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุด หรือสามารถใช้สารอาหารได้อย่างมีประสิทธิภาพที่สุด ที่แตกต่างกันอย่างไรก็ดี จากการศึกษาพบว่า ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ยีสต์จะสามารถเจริญได้ดีอยู่ระหว่าง 20 – 40 องศาเซลเซียส (White, 1954)

4. ค่าความเป็นกรด-ด่าง เช่นเดียวกับอุณหภูมิ ยีสต์แต่ละสายพันธุ์สามารถเจริญได้ดี ในสภาวะที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างที่ต่างกันไป แต่ช่วงความเป็นกรดเบสที่ยีสต์ส่วนใหญ่สามารถเจริญได้ดีอยู่ระหว่าง 3.5 – 7.0 (Rose และ Harrison, 1971)

การสกัดบีตากลูแคนจากผนังเซลล์ยีสต์

หลักการเบื้องต้นของการสกัดคือการทำให้เซลล์แตกเสียก่อน โดยการทำให้เซลล์แตกนี้สามารถทำได้ 3 วิธี คือ วิธีทางกายภาพ ทางเอนไซม์ และทางเคมี เมื่อเซลล์แตกแล้วจึงนำไป ปั่นเหวี่ยง (centrifuge) เพื่อแยกตะกอนออกมา ตะกอนที่ได้จะเป็นผนังเซลล์ของยีสต์ แล้วจึงนำ ผนังเซลล์ที่ได้ไปทำการสกัด การสกัดบีตากลูแคนจากผนังเซลล์ยีสต์สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 วิธีหลักๆ คือ การสกัดด้วยเอนไซม์ และการสกัดด้วยกรรมวิธีทางเคมี โดยบีตากลูแคนที่สกัดได้ ก็จะมีความบริสุทธิ์ที่แตกต่างกันออกไป เนื่องจากจะมีสารที่เป็น intracellular molecule ปนเปื้อน อยู่ในปริมาณที่แตกต่างกันนั่นเอง

การทำให้เซลล์แตก

กรรมวิธีทางกายภาพหรือทางกล

เครื่องมือหนึ่งที่เป็นที่นิยมใช้ในการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีทางกลคือเครื่องโฮโมจีไนเซอร์ โดยเครื่องนี้ทำงานโดยใช้แรงดันสูงถึง 20,000 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว โดยเครื่องจะดันของเหลวข้นของยีสต์เข้าไปในเครื่องผ่านช่องเล็กๆจึงทำให้เกิดแรงเฉือน (liquid shear) ที่ทำให้ผนังเซลล์ฉีกขาดนั่นเอง (Jazwinski, 1990) วิธีนี้ให้ผนังเซลล์ที่ค่อนข้างบริสุทธิ์ แต่เครื่องมือที่ใช้มีราคาแพง

กรรมวิธีทางเอนไซม์

การใช้เอนไซม์ในที่นี้หมายถึงการใช้เอนไซม์จากภายนอก โดยใช้เอนไซม์ในการย่อยผนังเซลล์ของยีสต์ ตัวอย่างเช่น เอนไซม์ไลโซไซม์ เอนไซม์ที่สกัดได้จากจุลินทรีย์ เม็ดเลือดขาว หรือหอยทาก เป็นต้น วิธีนี้ก็จะทำให้เราได้ผนังเซลล์ ที่มีความบริสุทธิ์สูงเช่นกัน แต่เอนไซม์ที่ใช้มักมีราคาแพง

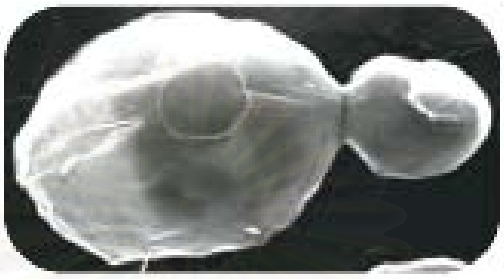
การใช้เอนไซม์อาจหมายรวมถึงการใช้เอนไซม์ภายในตัวของยีสต์เองหรือที่เรียกว่า การย่อยสลายตัวเองของยีสต์ (Yeast Autolysis) โดยเราสามารถกระตุ้นให้ยีสต์เกิดขบวนการนี้ ได้โดยการควบคุมสภาวะต่างๆ ได้แก่ อุณหภูมิ ความเป็นกรดเบส เวลา และความเข้มข้นของสารที่ใส่ไปกระตุ้น ภายใต้สภาวะที่ควบคุมนี้ จะทำให้ระบบเมตาบอลิซึมของยีสต์ทำงานผิดไป ส่งผลให้เซลล์ยีสต์ ตายและมีการย่อยสลายตัวเองตามมา

กรรมวิธีทางเคมี

การใช้สารเคมีในการย่อยสลายยีสต์แบ่งออกเป็น 2 ขบวนการหลักๆคือ

1. พลาสโมไลซิส (plasmolysis) โดยการใช้สารพลาสโมไลส์ (plasmolysing agent) ซึ่งโดยมากแล้วจะเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่มีขั้ว เช่น โทลูอีน คลอโรฟอร์ม ไอโซโพรพานอล และอะซีเตทเอสเทอร์ เป็นต้น หรือจะใช้สารละลายน้ำตาลความเข้มข้นสูงก็ได้ โดยสารที่นิยมใช้ คือโซเดียมคลอไรด์ (Kelly, 1983) เนื่องจาก สามารถช่วย

ป้องกันการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่นๆได้ เมื่อเซลล์ยีสต์อยู่ภายใต้ สภาวะที่มีความเข้มข้นภายนอกที่สูง จึงส่งผลต่อแรงดันออสโมติกในเซลล์ยีสต์เป็นผลให้เกิดการสูญเสียสมดุลของน้ำ ทำให้พลาสมา เมมเบรนเกิดการหดตัว และเกิดการรั่วไหลขององค์ประกอบภายในเซลล์ออกมาจนหมด ทำให้สามารถ ที่จะแยกผนังเซลล์ ได้ (Reed และ Nagodawithana, 1991)



(ที่มา : http://www.avogel.ca/en/shop/health_food/biostrath_elixir.php)

รูปที่ 2.8 เซลล์ยีสต์ที่เกิดการพลาสโมไลซิส

2. ไฮโดรไลซิส (hydrolysis) โดยการใช้กรดเกลือเข้มข้นร่วมกับความร้อน โดยจะช่วยย่อยสลายสารโมเลกุลใหญ่ภายในเซลล์ เช่น คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และกรดนิวคลีอิก ให้มีโมเลกุลที่เล็กลง และมีความสามารถในการละลายน้ำมากขึ้น ผลที่ได้จะประกอบด้วยยีสต์ไฮโดรไลเสต ซึ่งประกอบด้วยเกลือ 40% ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 13% และปริมาณแอลฟาอะมิโนไนโตรเจน 8% และผลพลอยได้ที่เหลือเป็นผนังเซลล์ (Reed และ Nagodawithana, 1991)

วิธีการสกัดบีตากลูแคนจากผนังเซลล์ยีสต์

สามารถทำได้โดยการใช้เอนไซม์ หรือการใช้สารเคมีในการสกัด โดยการใช้เอนไซม์ จะให้ผลผลิตคือบีตากลูแคนที่มีความบริสุทธิ์กว่า แต่ว่าต้นทุนที่ใช้ในการผลิตจะสูงกว่ามาก

1. <u>การสกัดโดยวิธี alkali-acid hydrolysis</u> เป็นวิธีการดั้งเดิมที่ยังคงมีความนิยม และมีการนำไปใช้มากในเชิงการค้า เนื่องจากมีต้นทุนต่ำ และกรรมวิธีไม่ซับซ้อน แต่ว่าบีตากลูแคนที่ได้ก็จะมีความบริสุทธิ์ต่ำเช่นกัน การสกัดด้วยกรด-ด่างนี้เริ่ม โดยการนำเซลล์ยีสต์มาสกัดด้วย 1 N NaOH ที่อุณหภูมิ 70^{O}C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง สารละลายด่างจะสกัดโปรตีน แมนแนน กลูแคนที่ละลายได้ในด่าง กรดนิวคลีอิก และลิปิดที่มีขั้ว

ออก ส่วนที่เหลือที่ไม่ละลายออกไปได้แก่ β-1,3-glucan, β-1,6-glucan-glycoprotein ซึ่งจะถูกสกัดต่อไปด้วย 1 N acetic acid ที่อุณหภูมิ 90^{O}C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง สารละลายกรดจะทำลายพันธะโควาเลนต์ระหว่าง β-1,3-glucan, β-1,6-glucan-glycoprotein ซึ่งเป็นผลให้โมเลกุลของไกลโคเจนมีขนาดเล็กลงจนสามารถละลายออกมาได้ รวมทั้งสามารถสกัดเอาไคติน ไคโตซาน และโปรตีนที่ยังตกค้างอยู่ออกมาได้ด้วย ส่วนบีตากลูแคนนั้นอาจถูกสกัดเอาเฉพาะส่วนของแขนงออกไปเท่านั้น อย่างไรก็ตามบีตากลูแคนที่เหลืออยู่นั้น อาจมีความบริสุทธิ์แค่เพียง 50% (w/w) เนื่องจากยังคงมีโมเลกุลขององค์ประกอบอื่นๆปนเปื้อนอยู่นั่นเอง (Synowiecki และ Nadia Ali, 2003) มีการศึกษาพบว่าหากมีการนำวิธีการทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่องโฮโมจีไนเซอร์ หรือเครื่องอัลตราโซนิคก่อน ก็จะสามารถช่วยเพิ่มผลผลิตและความบริสุทธิ์ของสารสกัดบีตากลูแคนได้ (Thammakiti และคณะ, 2002) ยิ่งไปกว่านั้นหากทำการสกัดด้วยกรด-ด่างร่วมด้วยการสกัดด้วยตัวทำละลาย พบว่าสามารถสกัดบีต้ากลูแคนที่มีความบริสุทธิ์ได้ถึง 96% (w/w) และมีปริมาณ ผลผลิตประมาณ 13% (w/w) ของเซลล์ยีสต์ (Jamas, Rha และ Sinskey, 1991) อย่างไรก็ดีการใช้กรด-ด่างในการสกัดเอาบีตากลูแคนนั้น สามารถให้ผลผลิตของ บีตากลูแคนได้ในปริมาณที่ต่ำ โดยมีสาเหตุมาจากการทำลายสายพอลิเมอร์ของ บีตากลูแคนโดยกรดและด่างที่ใช้นั่นเอง (Williams และ Lunzig, 1980)

2. <u>การสกัดด้วยเอนไซม์โปรติเอส</u> ร่วมด้วยการใช้น้ำร้อน เป็นวิธีที่สามารถช่วยลดความเสียหายของสายบีตากลูแคนได้ ทำได้โดยการสกัดด้วยน้ำร้อนเป็นอันดับแรกเพื่อสกัดเอาองค์ประกอบของผนังเซลล์ที่ละลายน้ำได้ออกไปก่อน แล้วสกัดโปรตีนด้วยเอนไซม์โปรติเอส และจึงทำการสกัดไขมันออกด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ด้วยวิธีนี้สามารถสกัดบีตากลูแคนที่บริสุทธิ์ได้ถึง 85% และได้ปริมาณผลผลิตสูงถึง 26% (w/w) ของเซลล์ยีสต์ (Freimund และคณะ, 2003)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเพาะเลี้ยงยีสต์ในอุตสาหกรรม

การเพาะเลี้ยงยีสต์ในถังหมักเป็นที่นิยมในการใช้งานจริงในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากถังหมักช่วยให้สามารถเลี้ยงเชื้อได้ในปริมาณมาก และสามารถควบคุมสภาวะต่างๆได้ และช่วยป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อชนิดอื่นๆได้อีกด้วย

ถังหมักโดยทั่วไปจะมีลักษณะเป็นทรงกระบอก ทำด้วยวัสดุที่ทนทานต่อกรด-ด่าง เช่น แก้ว และสแตนเลส เป็นต้น ภายในประกอบไปด้วยใบพัดสำหรับกวนอาหาร ท่อพ่นอากาศ บาฟเฟิล (baffle) และท่อสำหรับเติมสารเคมีต่างในการควบคุมสภาวะภายในถังหมัก

การเลี้ยงยีสต์ในถังหมักนั้นควรเลี้ยงในปริมาณที่ไม่เกิน 75% ของความจุของถังหมัก เพื่อป้องกันไม่ให้อาหารเกิดการล้นออกนอกถังหมักในกรณีที่มีการเกิดฟอง ทั้งนี้เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของอาหารด้วยอีกทางหนึ่ง (Nagodawithana, 1991)

การกวนของใบพัดภายในถังหมักจะช่วยให้ยีสต์สามารถผสมผสานเข้ากับทั้งอาหาร และออกซิเจนในอาหารได้อย่างทั่วถึง กล่าวคือใบพัดจะทำการกวนอาหารให้เข้ากัน ขณะเดียวกันก็เป็นการตีฟองอากาศในอาหารให้มีขนาดเล็กลง รวมทั้งกวนให้ยีสต์กระจายในอาหารอย่างทั่วถึง

การให้อากาศโดยทั่วไปจะให้อากาศจากทางด้านล่างของถังหมัก โดยการอัดอากาศผ่านเครื่องกรองเชื้อ และผ่านท่อขนาดพอเหมาะที่จะส่งอากาศเข้าไปในถังหมัก ปริมาณของอากาศที่ส่งเข้าไปในระบบถังหมักจะต้องพอเหมาะกับที่เชื้อต้องการ และต้องควบคุมปริมาณให้คงที่ เพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดฟองนั่นเอง

ในกรณีที่เกิดฟองขึ้น โดยมากฟองจะเกิดมากในช่วงที่ยีสต์กำลังเจริญเติบโต เนื่องจากยีสต์จะมีการขับสารเคมีบางชนิดออกจากเซลล์ เป็นผลให้น้ำหมักมีความหนืดสูงขึ้น ซึ่งทำให้อัตราการกวนของใบพัดสูงขึ้นตามลำดับ ฟองที่เกิดขึ้นนี้จะถูกควบคุมโดยการเติมสารกำจัดฟอง (antifoam) ลงไปเล็กน้อย หากเติมมากเกินไปจะส่งผลกระทบต่อการละลายของออกซิเจนใน น้ำหมักได้ (Finn, 1967)

ระบบที่มีความสำคัญในถังหมักอีกระบบหนึ่งคือระบบควบคุมอุณหภูมิ โดยถังหมักจะมีทั้งระบบหล่อเย็นและระบบทำความร้อน ระบบนี้จะควบคุมอุณหภูมิของน้ำหมักภายในถังหมัก ให้คงที่อยู่ตลอด โดยสามารถตั้งค่าอุณหภูมิให้เหมาะสมกับที่ยีสต์ต้องการในการเจริญ

ความเป็นกรด-ด่างภายในถังหมักจะถูกตรวจสอบโดยแท่งวัด (probe) อยู่ตลอดเวลา เมื่อค่าความเป็นกรดหรือด่างเปลี่ยนแปลงไปจากที่ตั้งเอาไว้ จะมีการสูบเอากรดหรือด่างเข้าสู่ ระบบเพื่อปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้คงที่อยู่เสมอ

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตบีตากลูแคน

มีรายงานวิจัยเกี่ยวกับการผลิตบีตากลูแคนที่ถูกตีพิมพ์ออกมาจำนวนไม่มากนัก เนื่องจากบีตากลูแคนเป็นผลิตภัณฑ์ทางอุตสาหกรรมที่มีมูลค่าสูง องค์ความรู้ที่มีประโยชน์ส่วนมากจะถูกพัฒนาโดยองค์กรทางธุรกิจ และความรู้ที่ได้จะถูกเก็บไว้เป็นเอกสิทธิ์ของบริษัทนั้นๆ อย่างไรก็ดี การศึกษาเกี่ยวกับบีตากลูแคนบางส่วนที่ตีพิมพ์ออกมา ก็ช่วยเป็นพื้นฐานความรู้สำหรับการวิจัยบีตากลูแคนได้บ้าง

มีการศึกษาการผลิตบีตากลูแคนที่ละลายได้ในน้ำโดยอาศัยการเพาะเลี้ยงยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* KCTC7913 ด้วยวิธีการหมัก 3 แบบ พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อด้วยวิธีการหมักแบบ batch จะพบมีปริมาณบีตากลูแคนสูงที่สุดในช่วง early stationary phase และเมื่อเลี้ยงด้วยวิธี continuous จะพบมีปริมาณบีตากลูแคนสูงสุดเมื่อใช้อัตราการเจือจาง (dilution rate) ต่ำ แต่พบว่าวิธีการหมักที่ดีที่สุดในการเลี้ยงยีสต์เพื่อผลิตบีตากลูแคนคือวิธีแบบ fed-batch คือมีปริมาณบีตากลูแคนที่ละลายได้ในน้ำที่ผนังเซลล์ 0.13 กรัมบีตากลูแคนต่อน้ำหนักแห้ง และมีอัตราการผลิตที่ 0.095 กรัมบีตากลูแคนต่อลิตรต่อชั่วโมง อย่างไรก็ตามองค์ประกอบของ ผนังเซลล์ของยีสต์จะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของยีสต์ (Kim และ Yun, 2006)

ก่อนหน้านั้นในปี 2004 Selbmann และคณะ ได้ทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Botryospaeria rhodina* ในถังหมัก 3 แบบต่างๆกัน คือถังหมักแบบกวน (stired tank reactor) ที่ใบพัดต่างกัน 2 ถัง และถังหมักแบบ air lift ตัวอีก 1 ถัง พบว่าเชื้อสามารถผลิตบีตากลูแคนได้ดีกว่าเมื่อใช้ถังหมักแบบ air lift กล่าวคือหากใช้ถังหมักแบบกวนจะสามารถผลิตบีตากลูแคนได้เพียง 0.42 กรัมต่อลิตรต่อ ชั่วโมง ในขณะที่ถังหมักแบบ air lift ช่วยให้ผลิตบีตากลูแคนได้ที่ 1.17 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

การศึกษาของ Flieger และคณะ ในปี 2003 พบว่า เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ *Claviceps viridis* CBS 125.63 ในถังหมักปริมาตร 5 ลิตร ชนิดกวน เป็นเวลา 7 วัน โดยไม่มีการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างภายในถังหมัก เชื้อสามารถผลิตพอลิแซคคาไรด์นอกเซลล์ได้ 1.9 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เมตรต่อวัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในวันที่ 3 ของการหมักพบมีกิจกรรมของเอนไซม์กลูคาเนสสูงที่สุด และมีปริมาณมวลเซลล์สูงที่สุดที่ 10-14 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร โดยพอลิแซคคาไรด์นอกเซลล์ที่เชื้อผลิตออกมาได้นั้น มีกลูแคนเป็นองค์ประกอบประมาณ 75%

บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์และวิธีดำเนินงานวิจัย

อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์

3.1 อุปกรณ์

- กล้องจุลทรรศน์คอมพาวด์ไมโครสโคป (compound microscope) Olympus รุ่น BX51 ของบริษัท Olympus optical Co.,Ltd., Japan

- กล้องจุลทรรศน์สเตอร์ริโอมโครสโคป (stereo microscope) Olympus รุ่น SZ60 ของบริษัท Olympus optical Co.,Ltd., Japan

- กล้องดิจิตอล Olympus รุ่น DP71 ของบริษัท Olympus optical Co.,Ltd., Japan

- เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (High speed refrigerated centrifuge) รุ่น J 2-21 ของบริษัท Beckman, USA

- เครื่องปั่นเหวี่ยงสารปริมาณน้อยแบบตั้งโต๊ะ

- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20 Genesys ของบริษัท Thermo Spectronic, USA

- หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) รุ่น SS-325 ของบริษัท Tomy Seiko, Japan, รุ่น MLS 3020 ของบริษัท Sanyo, Japan และรุ่น HV-25 ของบริษัท Hirayama, Japan

- เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator Shacker) รุ่น Innova 4330 ของบริษัท New Brunswick scientific, USA

- ตู้อบความร้อนแห้ง (Hot air oven) รุ่น UE 600 ของบริษัท Memmert, Germany

- ตู้อบฆ่าเชื้อ (Hot air oven) รุ่น D06063 ของบริษัท Memmert, Germany

- ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) รุ่น BE 800 ของบริษัท Memmert, Germany

- ตู้แช่เยือกแข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส รุ่น MDF-U356 D ของบริษัท Sanyo, Japan

- เครื่องชั่งหยาบ รุ่น PG 2002-S ของบริษัท Melter Toledo, Switzerland

- เครื่องชั่งละเอียด รุ่น AG 285 ของบริษัท Melter Toledo, Switzerland

- เครื่องวัดความเป็นกรดเบส (pH meter) รุ่น Cuberscan 1000 ของบริษัท Eutech Cybermatics, Singapore

- ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar Flow cabinet) รุ่น 25 Manometer ของบริษัท Dwyer Instrument, USA

- เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) รุ่น K-550 GE ของบริษัท Scientific Industries, USA

- ไมโครปิเปต (Micropipette) รุ่น P20, P100, P200, P1000, P5000 และ P10000 ของบริษัท Gilson, France

- ปิเปตทิป (Pipette tip) ขนาด 1-200 µl, 1 ml, 5 ml และ 10 ml ของบริษัท Axygen Scientific, USA

- เครื่องระเหิดแห้ง (Lyophilizer) รุ่น Eyela FD1 ของบริษัท Tokyo Rikakikai, Japan

- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)

- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (water bath shacker)

- โถดูดความชื้น (desiccater)

- ถังหมัก (Fermentor) ขนาด 2 ลิตร ของบริษัท B.E. Marubishi, Japan

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 เคมีภัณฑ์

- สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratory, USA
- แบคโตเพปโตน (Bacto peptone) ของบริษัท Difco Laboratory, USA
- สารสกัดจากมอลต์ (Malt extract) ของบริษัท Difco Laboratory, USA
- กลูโคส (Glucose) ของบริษัท Merck, Dramstadt, Germany
- ซูโครส (Sucrose) ของบริษัท Merck, Dramstadt, Germany
- กากน้ำตาล (Molasses) ของบริษัท นิวกรุงไทย, ไทย
- กลีเซอรอล (Glycerol) ของบริษัท Merck, Dramstadt, Germany
- กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (Concentration HCl) ของบริษัท Merck, Dramstadt, Germany
- กรดแอซิติกเข้มข้น (Concentration CH_3COOH) ของบริษัท Merck, Dramstadt, Germany
- กรดซัลฟิวริกเข้มข้น (Concentration H_2SO_4) ของบริษัท Merck, Dramstadt, Germany
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท Merck, Dramstadt, Germany
- โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท BHD Laboratory Supplies, England
- 95% เอทานอล ของบริษัท AlcoX
- สารกำจัดฟอง (Antifoam) ของบริษัท Siama Chemical,USA
- เอนไซม์กลูโคสออกซิเดส (glucose oxidase) ของบริษัท Biotech reagent, ไทย
- เอนไซม์อินเวอร์เทส (EC3.2.1.26 grade V) ของบริษัท Siama Chemical,USA
- โซเดียมอะซิเตต (sodium acetate) Merck, Dramstadt, Germany
- โซเดียมไฮโดรเจนฟอตเฟส ($Na_2HPO_4.12H_2O$)
- โพแทสเซียมแอมโมเนียมทาร์เทรต (potassium ammonium tartate.$4H_2O$)
- คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.7H_2O$)
- แอมโมเนียมโมลิบเดท ($(NH_4)6MoO_24.4H_2O$)
- โซเดียมอาซีเนท ($NaHasO_4.7H_2O$)
- ผลิตภัณฑ์ Innovacan™ ของบริษัท สเปเชียลตี้ ไบโอเทค จำกัด (Specialty Biotech Co;Ltd.)
- ชุดทดสอบยีสต์ API ID 32 C ของบริษัท BioMérieux , France
- สารมาตรฐานแมคฟาร์แลน เบอร์2 (McFarland Standard) ของบริษัท BioMérieux , France

ตารางที่ 3.1 แสดงสายพันธุ์ยีสต์จากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

Candida albican	TISTR 5239
Candida parapsilosis	TISTR 5008
Candida utilis	TISTR5046
Hansenula anomala	TISTR5082
Kloeckera apiculata	TISTR5090
Kluyveromyces marxianus	TISTR5116
Kluyveromyces marxianus var.*lactis*	TISTR5694
Debaryomyces hansenii var.*fabryi*	TISTR5668
Debaryomyces hansenii	TISTR5155
Yarrowia lipolytica	TISTR5621
Saccharomycopsis fibuligera	TISTR5033
Rhodotorula graminis	TISTR 5124
Saccharomyces cerevisiae	TISTR 5020
Saccharomyces cerevisiae	TISTR 5027
Saccharomyces cerevisiae	TISTR 5051
Schizosaccharomyces pombe	TISTR 5205
Saccharomyces cerevisiae	TISTR 5059
Saccharomyces cerevisiae	TISTR 5191
Sporobolomyces salmonicolor	TISTR5584
Trigonopsis flava	TISTR 5591

3.3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.3.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างดินและผลไม้สุกจากแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดกาญจนบุรี กรุงเทพฯ กระบี่ นครปฐม นครนายก ฉะเชิงเทรา เพชรบุรี สมุทรปราการ สุราษฎร์ธานี ราชบุรีและนครศรีธรรมราช โดยเก็บตัวอย่างละประมาณ 10 กรัม ใส่ในถุงพลาสติกซิบ บันทึกชนิดของตัวอย่าง สถานที่เก็บ ลักษณะ และสีของตัวอย่าง ระหว่างที่ตัวอย่างถูกวิเคราะห์ เก็บใส่ถุงพลาสติกซิบรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากวิเคราะห์แล้วเก็บรักษาตัวอย่างที่อุณหภูมิ 4°C

3.3.2 การคัดแยกยีสต์จากตัวอย่าง

นำตัวอย่างดิน 1 กรัม ใส่ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 9 มิลลิลิตร ทำการเจือจางแล้วเกลี่ยลงบนอาหารแข็ง YM ซึ่งปรับค่าความเป็นกรดเบสให้เท่ากับ 4.5 (ภาคผนวก ก) เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (Campbell และ JH Duffus, 1998) สำหรับผลไม้สุกนั้นนำมาแยกเชื้อโดยใช้ลูปเขี่ยบริเวณผิวของผลไม้ ขีดลงบนอาหารแข็ง YM ซึ่งปรับค่าความเป็นกรดเบสให้เท่ากับ 4.5 จากนั้นนำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีของยีสต์ที่มีขนาดใหญ่และมีลักษณะแตกต่างกัน แยกจนได้โคโลนีเดี่ยว

3.3.3 การเก็บรักษายีสต์ที่ใช้ในงานวิจัย

ถ่ายยีสต์ที่คัดเลือกได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเอียง YM เก็บไว้ที่อุณหภูมิบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อทำการทดลองต่อไปและถ่ายเชื้อลงอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเอียงใหม่ทุกๆ 1 เดือน สำหรับการเก็บรักษาเป็นระยะเวลานานจะใช้วิธีทำให้แห้งหลังการแช่เยือกแข็ง (lyophilization) แล้วเก็บรักษาไว้ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20°C

3.3.4 การคัดกรองยีสต์

3.3.4.1 คัดกรองยีสต์จากดินและผลไม้สุก

โดยคัดเลือกจากการนำยีสต์แต่ละไอโซเลตที่คัดแยกมาได้จากข้อ 3.3.2 มาเลี้ยงในอาหารเหลว YM (ภาคผนวก ก) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปกระจายในสารละลายน้ำเกลือ 0.85% น้ำหนักต่อปริมาตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตรและปรับให้มีค่าเป็น 0.5 จากนั้นนำมาหยด (ปริมาตร 5 ไมโครลิตร)

ลงบนอาหารแข็ง YM (ภาคผนวก ก) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี การคัดเลือกยีสต์ที่มีขนาดโคโลนีใหญ่ที่สุดและมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกัน จากตัวอย่างดิน 10 สายพันธุ์และจากตัวอย่างผลไม้สุก 10 สายพันธุ์เพื่อทำการทดลองต่อไป

3.3.4.2 นำยีสต์ที่ทราบสายพันธุ์ 20 สายพันธุ์จากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) เพื่อหาปริมาณบีตากลูแคนต่อไป

3.3.5 การเตรียมหัวเชื้อเพื่อเลี้ยงยีสต์ในการผลิตบีตากลูแคน

ถ่ายยีสต์ที่ต้องการเลี้ยงจากหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเอียง ลงในอาหารเหลว YM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อกระตุ้นการเจริญของเชื้อ จากนั้นถ่ายเชื้อ 5%โดยปริมาตรลงในอาหารชนิดเดียวกับข้างต้น บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเจือจางจนได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตรเท่ากับ 0.5 จึงนำมาใช้เป็นกล้าเชื้อต่อไป

3.3.6 การเลี้ยงยีสต์เพื่อผลิตบีตากลูแคน

ถ่ายกล้าเชื้อจากการเตรียมในข้อ 3.3.5 ปริมาณ 5% โดยปริมาตรลงในอาหารเหลว YM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เลี้ยงยีสต์ตามสภาวะที่ต้องการศึกษาเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุกๆ 3 ชั่วโมง เพื่อวัดการเจริญโดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง วิเคราะห์ปริมาณสารตั้งต้น (substrate) ที่ลดลงและวิเคราะห์ปริมาณบีตากลูแคนที่ผลิตได้

3.3.6.1 การวัดการเจริญของยีสต์

นำตัวอย่างมาปั่นแยกเซลล์ออกโดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส โดยใช้ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนใสออกเพื่อเก็บไว้วิเคราะห์ปริมาณสารตั้งต้นต่อไป จากนั้นนำตะกอนเซลล์ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง นำเซลล์ที่แยกได้ใส่ในกระทงที่ทราบน้ำหนักแล้ว นำไปอบที่ตู้อบอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาใส่ในโถดูดความชื้น นำกระทงไปชั่งด้วยเครื่องชั่งละเอียดจนได้น้ำหนักคงที่คำนวณน้ำหนักเซลล์แห้ง

3.3.6.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์โดยวิธี Somogyi-Nelson (Nelson, 1944 ; Somogyi, 1952)

นำตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่อัลคาไลน์คอปเปอร์ รีเอเจนต์ (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทันที จากนั้นนำไปแช่ในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติม เนลสัน รีเอเจนต์ (ภาคผนวก ข) 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 30 นาทีแล้วผสมให้เข้ากันเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร เพื่อหาความเข้มข้นของน้ำตาล เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 1-10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค)

3.3.7 การวิเคราะห์ปริมาณบีตากลูแคนจากยีสต์ที่คัดเลือกได้

นำยีสต์ที่คัดเลือกได้ทั้งหมด 40 สายพันธุ์จากข้อ 3.3.4 มาเลี้ยงตามวิธีในข้อ 3.3.6 โดยเก็บตัวอย่างที่ 24 ชั่วโมงจากนั้นหาปริมาณบีตากลูแคนโดย

3.3.7.1 การเตรียมเซลล์เพื่อสกัดบีตากลูแคน

นำยีสต์มากระจายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อโดยให้มีปริมาตรของแข็งเป็น 15% โดยน้ำหนัก ปรับค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นเป็น 5.0 นำไปบ่มที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงจากนั้นเพิ่มอุณหภูมิเป็น 80 องศาเซลเซียส 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอนไว้ในขั้นต่อไป

3.3.7.2 การสกัดบีตากลูแคน

นำตะกอนจากข้อ 3.3.7.1 มาเติม 1.0 โมลาร์ โซเดียมไฮดรออกไซด์ (ภาคผนวก ข) ปริมาณ 5 เท่าจากนั้นนำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 80±5 องศาเซลเซียส ที่มีการเขย่าเป็นเวลา 2 ชั่วโมงจากทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนและล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง จากนั้นเติม 0.5 โมลาร์กรดแอซิติก(ภาคผนวก ข) ปริมาตร 5 เท่า นำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 75±5 องศาเซลเซียส ที่มีการเขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงและล้างตะกอนที่เหลือด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง เก็บตะกอนบีตากลูแคนไปทำไลโอฟิไลซ์เพื่อเก็บไว้วิเคราะห์ปริมาณบีตากลูแคนต่อไป

3.3.7.3 การวิเคราะห์ปริมาณบีตากลูแคน

นำบีตากลูแคนที่สกัดได้จากข้อ 3.3.7.2 ไปไฮโดรไลซ์ด้วยกรด โดยชั่งตะกอนบีตากลูแคน 0.5 มิลลิกรัม เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 โมลาร์ (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 1 มิลลิลิตรในหลอดทดลองแต่ละหลอด จากนั้นนำไปให้ความร้อนที่ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง เพื่อย่อยพอลิแซคคาร์ไรด์ให้เป็นมอโนแซคคาไรด์ซึ่งได้แก่กลูโคสและวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสโดยใช้เอนไซม์กลูโคสออกซิเดสจากชุดทดสอบสำเร็จรูปโดยใช้ตัวอย่าง ปริมาตร 10 ไมโครลิตรและเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร เพื่อหาความเข้มข้นของน้ำตาลโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส (ภาคผนวก ค) ซึ่งวิธีคำนวณปริมาณน้ำตาลกลูโคสทั้งหมดที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ด้วยกรดทำได้โดย

$$\text{ปริมาณกลูโคสทั้งหมด (มิลลิกรัม) (Total glucose)} = \frac{\text{OD 500} \times \text{dilution}}{\text{slope}} \times \text{ปริมาตรทั้งหมดในการไฮโดรไลซ์ (มิลลิลิตร)}$$

นำปริมาณกลูโคสทั้งหมดที่ได้ไปหาปริมาณกลูแคนโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณกลูโคสและปริมาณกลูแคน ซึ่งกราฟมาตรฐานนี้ทำได้โดย ชั่งบีตากลูแคน (Innovacan™) 0 - 1 มิลลิกรัม ไฮโดรไลซ์ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปให้ความร้อนที่ 120 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 ชั่วโมง วัดปริมาณกลูโคสที่ได้จากบีตากลูแคนปริมาณต่างๆแล้วนำไปทำเป็นกราฟมาตรฐาน(ภาคผนวก ค)

ปริมาณบีตากลูแคนที่ได้นี้จะเป็นปริมาณจากตะกอนบีตากลูแคน 0.5 มิลลิกรัม ดังนั้นปริมาณบีตากลูแคนทั้งหมดจึงคำนวณโดย

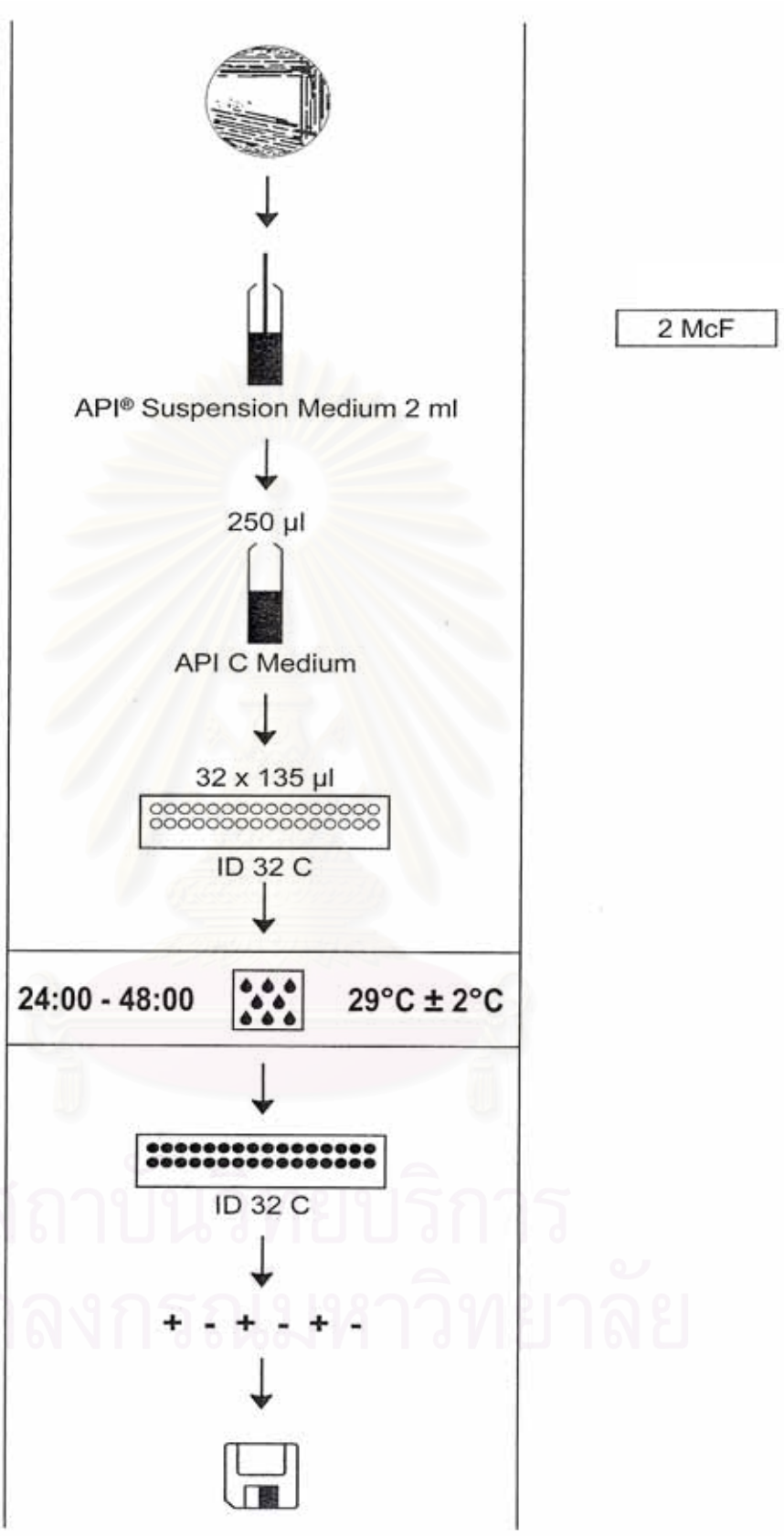
$$\text{ปริมาณบีตากลูแคนทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{ปริมาณกลูโคสทั้งหมด (มิลลิกรัม)}}{\text{slope}} \times \text{ตะกอนบีตากลูแคน (กรัมต่อลิตร)}$$

3.3.8 การจัดจำแนกสายพันธุ์ยีสต์ที่ให้บีตากลูแคนปริมาณสูง

ยีสต์ที่คัดแยกได้จากดินและผลไม้สุกเมื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณบีตากลูแคนตามวิธีในข้อ 3.3.7 แล้วพบว่ามีปริมาณบีตากลูแคนสูงเป็น 5 ลำดับแรก จะนำมาจัดจำแนกสายพันธุ์โดยใช้ชุดทดสอบยีสต์ API ID 32 C (ภาคผนวก ง) ซึ่งประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด 31 ชนิด ได้แก่ D-Galactose Cycloheximide(Actidione) D-Saccharose (sucrose) N-Acetyl-Glucosamine Lactic acid L-Arabinose D-Cellobiose D-Raffinose D-Moltose D-Trehalose Potassium 2-Ketogluconate Methyl-αD-Glucopyranoside D-Mannitol D-Lactose (bovine origin) Inositol D-Sorbitol D-Xylose D-Ribose Glycerol L-Rhamnose Palatinose Erythriol D-Melibiose Sodium Glucuronate D-Melezitose Potassium Gluconate Levulinic acid (Levulinate) D-Glucose L-Sorbose Glucosamine Esculin Ferric citrate โดยเลี้ยงยีสต์ที่ต้องการจัดจำแนกสายพันธุ์บนอาหารแข็งให้มีอายุประมาณ 24-48 ชั่วโมง จากนั้นเลือกโคโลนีเดี่ยวไปกระจายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 2 มิลลิลิตรให้มีความขุ่นเท่ากับสารมาตรฐานแมคฟาร์แลนเบอร์ 2 จากนั้นนำไปใส่ API C Medium (ภาคผนวก ง) แล้วใส่ลงในชุดทดสอบ บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เก็บผลที่ 24 และ 48 ชั่วโมง โดยดูจากความขุ่น ผลบวกคือมีความขุ่นมากกว่าเมื่อเทียบกับชุดควบคุมจากนั้นนำผลที่บันทึกได้ไปกรอกข้อมูลในโปรแกรมของ apiweb ™ เพื่อจัดจำแนกสายพันธุ์ของยีสต์

การศึกษาสัณฐานวิทยาของยีสต์นั้นทำการศึกษาลักษณะโคโลนีโดยใช้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ ในส่วนของการศึกษาลักษณะของเซลล์ยีสต์ภายใต้กล้องนั้นใช้จุลทรรศน์คอมพาวด์โดยบันทึกภาพและตั้งค่าขนาดของบาร์โดยกล้องดิจิตอลและโปรแกรม DP manager

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.1 ขั้นตอนการจัดจำแนกสายพันธุ์ยีสต์โดยใช้ชุดทดสอบ API ID 32 C

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ลักษณะของตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างดินและผลไม้ตามแหล่งต่างๆ 10 จังหวัด ในประเทศไทย จำนวน 55 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 4.1 และ 4.2

4.2 การคัดกรองยีสต์จากอัตราการเจริญบนอาหาร YM

การคัดแยกยีสต์จากดินและผลไม้สุกจากแหล่งต่างๆ จำนวน 55 ตัวอย่าง นำมาคัดแยกยีสต์โดยวิธีในข้อ 3.3.4 สามารถคัดแยกยีสต์ได้ 127 สายพันธุ์ ซึ่งได้ทำการคัดเลือกยีสต์ที่มีลักษณะทางสันฐานวิทยาที่ต่างกันและเจริญได้เร็วที่สุดจากดิน 10 สายพันธุ์และจากผลไม้ 10 สายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 4.3

นำยีสต์ที่ทราบสายพันธุ์แล้วจากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) มาจำนวน 20 สายพันธุ์ และกำหนดรหัสเพื่อความสะดวกสำหรับการทดลองต่อไปเป็น Y1-Y20 ดังแสดงในตารางที่ 4.4

4.3 การคัดกรองยีสต์ตามปริมาณบีตากลูแคน

นำยีสต์ทั้ง 40 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 4.2 มาวิเคราะห์ปริมาณบีตากลูแคนเพื่อคัดเลือกยีสต์ที่ให้ปริมาณบีตากลูแคนมากที่สุด 5 สายพันธุ์ โดยเลี้ยงยีสต์ตามวิธีในข้อ 3.3.2 จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณบีตากลูแคนตามวิธีในข้อ 3.3.3 พบว่ายีสต์ที่ให้ปริมาณบีตากลูแคนออกมามากที่สุด ได้แก่ *Debaryomyces hansenii* TISTR5155 (Y9) *Kluyveromyces marxianus* TISTR5116 (Y6) F17 *Kloeckera apiculata* TISTR5090 (Y5) และ F18 ตามลำดับ โดยให้ปริมาณบีตากลูแคน 0.65 0.62 0.61 0.59 และ 0.58 มิลลิกรัม ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.1 ดังนั้นจึงเลือกยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์นี้เพื่อทำการทดลองในขั้นต่อไป

ตารางที่ 4.1 แสดงแหล่งที่มา ลักษณะของตัวอย่างดินและจำนวนยีสต์ที่แยกได้

ลำดับตัวอย่าง	ประเภทตัวอย่าง	แหล่งที่เก็บ	ลักษณะของตัวอย่าง	จำนวนยีสต์
1	ดินสวนยางพารา	อ.บ่อพลอย จ.กาญจนบุรี	เนื้อร่วน ชื้น สีน้ำตาลดำ	1
2	ดินโคนต้นไม้	อ.นางรอง จ.นครนายก	เนื้อร่วน ชื้น สีน้ำตาล	2
3	ดินริมน้ำตก	อ.นางรอง จ.นครนายก	เนื้อร่วน เปียก สีน้ำตาล	-
4	ดินโคนต้นไม้	อ.สาริกา จ.นครนายก	เนื้อร่วน ชื้น สีน้ำตาลดำ	4
5	ดินนาข้าว	อ.องครักษ์ จ.นครนายก	เนื้อเหนียว สีดำ	1
6	ดินใต้ต้นไม้น้ำตกไทรโยคน้อย	อ.ไทรโยค จ.กาญจนบุรี	เนื้อร่วน ชื้น สีดำ	1
7	ดินใต้ต้นไม้น้ำตกไทรโยคใหญ่	อ.ไทรโยค จ.กาญจนบุรี	เนื้อร่วน ชื้น สีน้ำตาล	-
8	ดินโคนต้นไม้	อ.บ้านโป่ง จ.ราชบุรี	เนื้อร่วน ชื้น สีดำ	3
9	ดินริมน้ำตกไทรโยคใหญ่	อ.ไทรโยค จ.กาญจนบุรี	เนื้อร่วน เปียก สีน้ำตาลเข้ม	-
10	ดินโคนต้นไม้น้ำตกไทรโยคใหญ่	อ.ไทรโยค จ.กาญจนบุรี	เนื้อร่วน ชื้น สีน้ำตาลดำ	1
11	ดินโคนต้นไม้	อ.ตาพระยา จ.กระบี่	เนื้อร่วน ชื้น สีน้ำตาล	3
12	ดินสนามหญ้า	อ.เมือง จ.เพชรบุรี	เนื้อร่วน ชื้นสีดำ	1
13	ดินใต้ต้นไม้	อ.เมือง จ.เพชรบุรี	เนื้อร่วน สีดำ	3
14	ดินริมคลอง	อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม	เนื้อเหนียว สีน้ำตาลดำ	1
15	ดินสวนผัก	อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม	เนื้อเหนียว สีดำ	3
16	ดินไร่อ้อย	อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม	เนื้อร่วน แห้ง สีน้ำตาล	2
17	ดินโคนต้นมะม่วง	อ.เมือง จ.นครปฐม	เนื้อร่วน ชื้น สีน้ำตาล	3
18	ดินสวนยางพารา	อ.ขนอม จ.นครศรีธรรมราช	เนื้อร่วน ชื้น สีน้ำตาลแดง	5
19	ดินสวนลองกอง	อ.ขนอม จ.นครศรีธรรมราช	เนื้อร่วน ชื้น สีน้ำตาลแดง	3

ตารางที่ 4.1 (ต่อ) แสดงแหล่งที่มา ลักษณะของตัวอย่างดินและจำนวนยีสต์ที่แยกได้

ลำดับตัวอย่าง	ประเภทตัวอย่าง	แหล่งที่เก็บ	ลักษณะของตัวอย่าง	จำนวนยีสต์
20	ดินโคนต้นมะขาม	อ.พระสมุทรเจดีย์ จ.สมุทรปราการ	เนื้อร่วน ชื้น สีน้ำตาล	3
21	ดินโคนต้นไม้	อ.ท่ามะกา จ.กาญจนบุรี	เนื้อร่วน ชื้น สีน้ำตาลดำ	4
22	ดินไร่อ้อย	อ.ท่ามะกา จ.กาญจนบุรี	เนื้อร่วน แห้ง สีน้ำตาล	2
23	ดินสวนยางพารา	อ.จอมบึง จ.ราชบุรี	เนื้อร่วน ชื้น สีน้ำตาลดำ	4
24	ดินสวนเงาะ	อ.บ้านนาสาร จ.สุราษฎร์ธานี	เนื้อร่วน ชื้น สีน้ำตาลดำ	3
25	ดินโคนต้นไม้	อ.พนมสารคาม จ.ฉะเชิงเทรา	เนื้อร่วน ชื้น สีดำ	2
26	ดินสวนดอกไม้	อ.พนมสารคาม จ.ฉะเชิงเทรา	เนื้อร่วน ชื้น สีน้ำตาลดำ	3
27	ดินโคนต้นไม้	อ.ปทุมวัน จ.กรุงเทพฯ	เนื้อร่วน แห้ง สีน้ำตาลดำ	1
28	ดินสนามหญ้า	อ.ปทุมวัน จ.กรุงเทพฯ	เนื้อร่วน ชื้น สีน้ำตาลดำ	2
29	ดินโคนต้นไม้	อ.ราชเทวี จ.กรุงเทพฯ	เนื้อร่วน แห้ง สีดำ	2
30	ดินริมสระน้ำ	อ.ราชเทวี จ.กรุงเทพฯ	เนื้อร่วน ชื้น สีดำ	1

ตารางที่ 4.2 แสดงแหล่งที่มา ลักษณะของตัวอย่างไม้และจำนวนยีสต์ที่แยกได้

ลำดับตัวอย่าง	ผลไม้	ระดับความสุก	จำนวนยีสต์
1	มะละกอ	+	2
2	มะละกอ	++	3
3	ลำใย	+	3
4	ลองกอง	+	1
5	ลองกอง	++	3
6	ชมพู่	+	1

ตารางที่ 4.2 (ต่อ) แสดงแหล่งที่มา ลักษณะของตัวอย่างผลไม้และจำนวนยีสต์ที่แยกได้

ลำดับตัวอย่าง	ผลไม้	ระดับความสุก	จำนวนยีสต์
7	ชมพู่	++	2
8	มังคุด	+	2
9	เงาะ	+	3
10	ฝรั่ง	+	2
11	ฝรั่ง	++	4
12	สละ	+	2
13	มะม่วง	+	3
14	มะม่วง	++	4
15	แอปเปิ้ล	+	1
16	แอปเปิ้ล	++	2
17	สับปะรด	+	2
18	สตรอเบอรี่	+	3
19	องุ่น	+	3
20	องุ่น	++	4
21	ส้ม	+	2
22	ลิ้นจี่	+	3
23	น้อยหน่า	+	2
24	กล้วย	+	2
25	กล้วย	++	4

\+ สุกงอม, เนื้อไม่เละ, ผิวไม่ช้ำมาก

++ สุกงอม, เนื้อเละ, ผิวช้ำมาก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.3 แสดงรายละเอียดข้อมูลของตัวอย่างและยีสต์ที่คัดแยกได้

ลำดับที่	สายพันธุ์	ตัวอย่าง (ดิน / ผลไม้)	ลักษณะทางสันฐานวิทยา	การกระจายของโคโลนี (มม.)
1	F2	สับปะรด	โคโลนีสีครีม ตรงกลางนูน ขอบมีลักษณะเป็นขุยเล็กน้อย	8
2	F13	มะละกอ	โคโลนีสีครีม ตรงกลางนูนเล็กน้อย ขอบเรียบแบน	7
3	F17	ชมพู่	โคโลนีสีครีมเหลือง ตรงกลางนูนมาก ขอบเรียบ	9
4	F18	องุ่น	โคโลนีสีครีมเหลือง นูนเล็กน้อย ขอบหยัก	7.5
5	F19	องุ่น	โคโลนีสีครีมเหลือง ตรงกลางนูน ขอบมีลักษณะเป็นขุยเล็กน้อย	8
6	F21	กล้วย	โคโลนีสีครีมเหลือง ตรงกลางนูนมาก ขอบเรียบ	7
7	F22	กล้วย	โคโลนีสีครีมเหลือง ตรงกลางนูน ขอบหยัก	8.5
8	F37	ลำไย	โคโลนีสีครีมเหลือง ตรงกลางนูนเล็กน้อย ขอบหยักเล็กน้อย	8
9	F41	มะม่วง	โคโลนีสีครีมเหลือง แบนๆ ขอบหยัก	8
10	F46	ลองกอง	โคโลนีสีครีม ตรงกลางนูน ขอบเรียบ	8
11	S3	ดินนาข้าว อ.องครักษ์ จ.นครนายก	โคโลนีสีครีมเหลือง ตรงกลางนูนมีลักษณะเป็นขุย ขอบหยัก	8
12	S6	ดินโคนต้นไม้ อ.สาริกา จ.นครนายก	โคโลนีสีครีม ตรงกลางนูน ขอบมีลักษณะเป็นขุย	7.5
13	S9	ดินโคนต้นไม้ อ.สาริกา จ.นครนายก	โคโลนีสีครีม ตรงกลางนูน ขอบเรียบ	7.5

39

ตารางที่ 4.3 (ต่อ) แสดงรายละเอียดข้อมูลของตัวอย่างและยีสต์ที่คัดแยกได้

ลำดับที่	สายพันธุ์	ตัวอย่าง (ดิน / ผลไม้)	ลักษณะทางสันฐานวิทยา	การกระจายของโคโลนี (มม.)
14	S13	ดินสวนยางพารา อ.จอมบึง จ.ราชบุรี	โคโลนีสีครีมขาว ตรงกลางนูน ขอบเรียบ	8
15	S14	ดินสวนยางพารา อ.จอมบึง จ.ราชบุรี	โคโลนีสีครีมเหลืองเล็กน้อย ตรงกลางนูน ขอบหยัก	7
16	S15	ดินสวนเงาะ อ.บ้านนาสาร จ.สุราษฎร์ธานี	โคโลนีสีครีม ผิวด้านเป็นขุยๆเล็กน้อย ตรงกลางนูน ขอบเรียบ	8.5
17	S16	ดินสวนเงาะ อ.บ้านนาสาร จ.สุราษฎร์ธานี	โคโลนีสีครีมเหลือง ตรงกลางนูน ขอบหยัก	8
18	S26	ดินโคนต้นไม้ อ.พนมสารคาม จ.ฉะเชิงเทรา	โคโลนีสีครีมขาว นูนเล็กน้อย ขอบเรียบ	7
19	S52	ดินไร่อ้อย อ.กำแพงแสน จ..นครปฐม	โคโลนีสีครีมเหลือง ตรงกลางนูน ขอบเรียบ	8
20	S62	ดินสวนผัก อ.กำแพงแสน จ..นครปฐม	โคโลนีสีครีมเหลืองมาก ตรงกลางนูน ขอบเรียบ	9

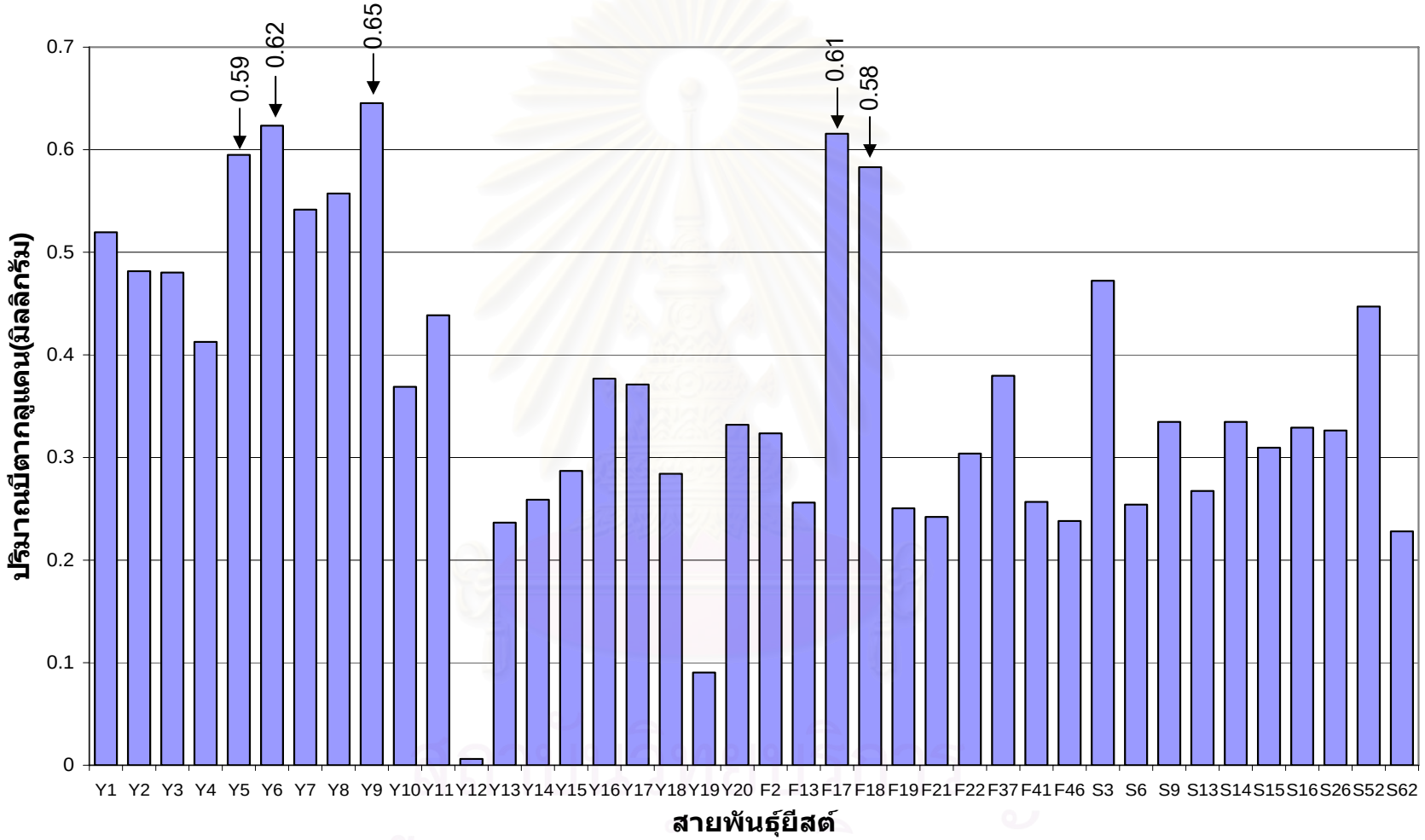
* วัดการกระจายของโคโลนีที่ 24 ชั่วโมงโดยวิธี drop plate

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

40

ตารางที่ 4.4 แสดงสายพันธุ์ยีสต์ที่นำมาจากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ที่กำหนดรหัสเพื่อใช้ในงานวิจัยครั้งนี้

ลำดับที่	สายพันธุ์	รหัส
1	*Candida albican* TISTR 5239	Y1
2	*Candida parapsilosis* TISTR 5008	Y2
3	*Candida utilis* TISTR5046	Y3
4	*Hansenula anomala* TISTR5082	Y4
5	*Kloeckera apiculata* TISTR5090	Y5
6	*Kluyveromyces marxianus* TISTR5116	Y6
7	*Kluyveromyces marxianus* var.*lactis* TISTR5694	Y7
8	*Debaryomyces hansenii* var.*fabryi* TISTR5668	Y8
9	*Debaryomyces hansenii* TISTR5155	Y9
10	*Yarrowia lipolytica* TISTR5621	Y10
11	*Saccharomycopsis fibuligera* TISTR5033	Y11
12	*Rhodotorula graminis* TISTR 5124	Y12
13	*Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5020	Y13
14	*Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5027	Y14
15	*Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5051	Y15
16	*Schizosaccharomyces pombe* TISTR 5205	Y16
17	*Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5059	Y17
18	*Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5191	Y18
19	*Sporobolomyces salmonicolor* TISTR5584	Y19
20	*Trigonopsis flava* TISTR 5591	Y20



รูปที่ 4.1 แสดงปริมาณบีตากลูแคน ของยีสต์ 40 สายพันธุ์

42

4.4 การจัดจำแนกสายพันธุ์ยีสต์ที่คัดแยกได้และให้ปริมาณบีตากลูแคนสูง

ในการทดลองข้างต้นในการหาปริมาณบีตากลูแคนของยีสต์ทั้ง 40 สายพันธุ์พบว่ายีสต์ที่ทำการคัดแยกจากดินและผลไม้สุกนั้นสายพันธุ์ F17 และ F18 ซึ่งแยกได้จากชมพู่และองุ่นตามลำดับ มีปริมาณบีตากลูแคนสูงใน 5 อันดับแรกจึงเลือกมาทำการจัดจำแนกสายพันธุ์การใช้ชุดทดสอบ API ID 32 C เพื่อจัดจำแนกสายพันธุ์ของยีสต์นั้นเป็นการจำแนกยีสต์โดยใช้ความสามารถในการใช้คาร์โบไฮเดรต (assimilation) ที่แตกต่างกันซึ่งหากยีสต์สามารถใช้คาร์โบไฮเดรตชนิดนั้นๆได้จะเกิดความขุ่นขึ้น พบว่ามีการใช้คาร์โบไฮเดรตแต่ละชนิด ดังนี้

ตารางที่ 4.5 รูปแบบการใช้คาร์โบไฮเดรตของยีสต์สายพันธุ์ F17 และ F18 โดยใช้ชุดทดสอบ API ID 32 C ที่เวลา 48 ชั่วโมง

ชนิดคาร์โบไฮเดรต	สายพันธุ์ยีสต์	
	F17	F18
Control	-	-
D-Galactose	+	-
Cycloheximide (Actidione)	-	-
D-Saccharose (sucrose)	+	-
N-Acetyl-Glucosamine	+	+
Lactic acid	-	+
L-Arabinose	+	-
D-Cellobiose	-	-
D-Raffinose	-	-
D-Moltose	+	-
D-Trehalose	+	-
Potassium 2-Ketogluconate	+	-
Methyl-αD-Glucopyranoside	+	-
D-Mannitol	+	-
D-Lactose (bovine origin)	-	-
Inositol	-	-

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

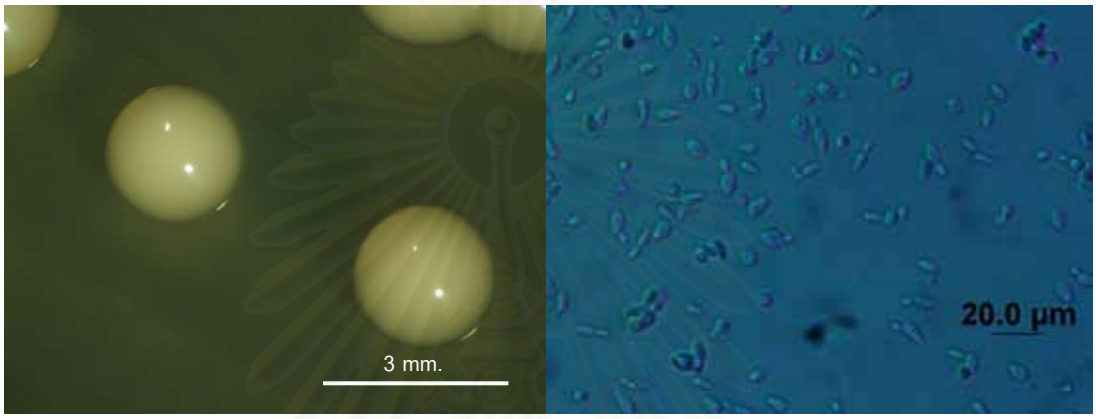
ชนิดคาร์โบไฮเดรต	สายพันธุ์ยีสต์	
	F17	F18
D-Sorbitol	+	-
D-Xylose	+	-
D-Ribose	-	-
Glycerol	+	-
L-Rhamnose	-	-
Palatinose	+	-
Erythriol	-	-
D-Melibiose	-	-
Sodium Glucuronate	-	-
D-Melezitose	+	-
Potassium Gluconate	+	-
Levulinic acid (Levulinate)	+	-
D-Glucose	+	+
L-Sorbose	+	-
Glucosamine	+	-
Esculin	-	-
Ferric citrate		

(+) = สามารถใช้ได้ เจริญได้ มีลักษณะขุ่นกว่าชุดควบคุม

(-) = ไม่สามารถใช้ได้ ไม่สามารถเจริญได้ มีลักษณะขุ่นน้อยกว่า / เท่ากับชุดควบคุม

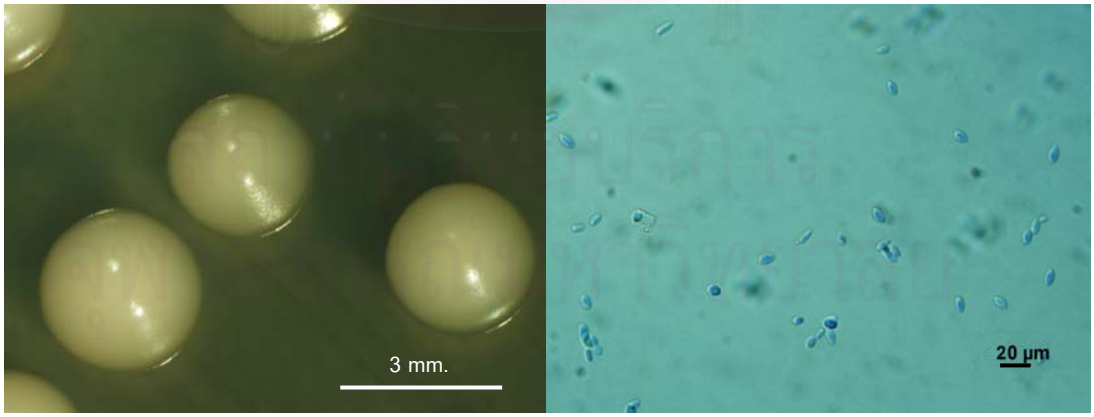
จากข้อมูลการใช้คาร์โบไฮเดรตตามตารางข้างต้นเมื่อเทียบกับฐานข้อมูลจาก http://apiweb.biomerieux.com พบว่า ยีสต์ F17 ถูกจัดจำแนกเป็น *Candida parapsilosis* โดยมี %idenity ถึง 99.9% ส่วน F18 พบว่าเป็น *Candida krusei* แต่ %idenity นั้นมีค่าเพียง 85.7% ซึ่งควรศึกษาการจัดจำแนกเพิ่มเติมโดยใช้ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อจัดจำแนกสายพันธุ์ได้แน่นอนยิ่งขึ้น

ลักษณะของโคโลนีของยีสต์บนอาหารแข็งYMและลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของยีสต์ 5 สายพันธุ์ที่มีบีตากลูแคนปริมาณสูง ได้แก่ *Kloeckera apiculata* TISTR5090 (Y5) *Kluyveromyces marxianus* TISTR5116 (Y6) *Debaryomyces hansenii* TISTR5155 (Y9) *Candida parapsilosis* (F17) *Candida krusei* (F18) แสดงดังรูปที่ 4.2 4.3 4.4 4.5 และ 4.6 ตามลำดับ



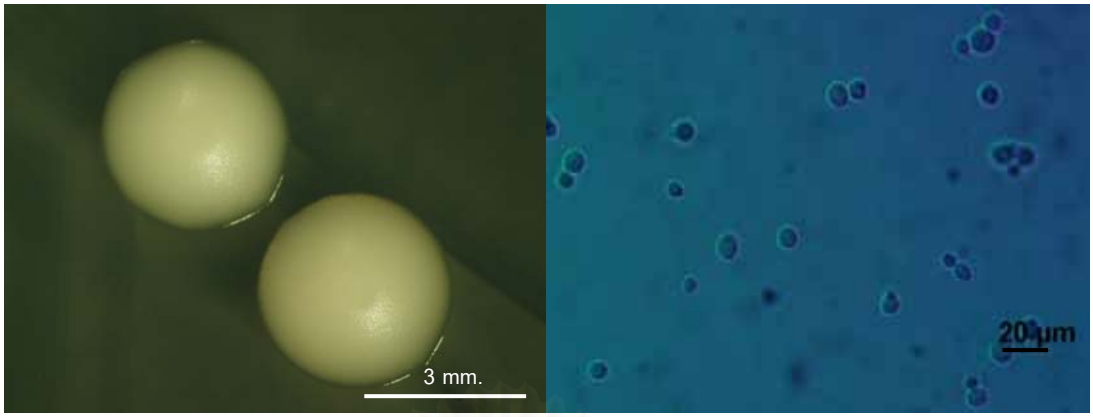
ก ข

รูปที่ 4.2 ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง YM (ก) และลักษณะรูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า (ข) ของ *Kloeckera apiculata* TISTR5090 (Y5)



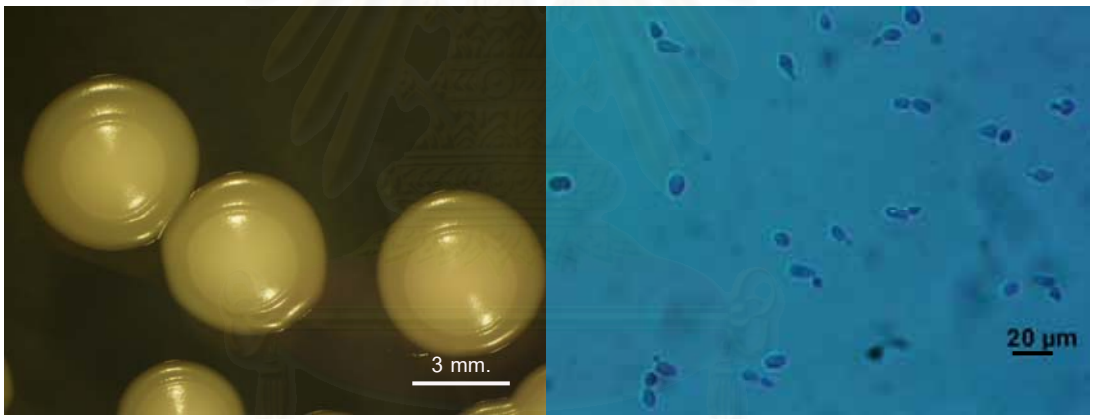
ก ข

รูปที่ 4.3 ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง YM (ก) และลักษณะรูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า (ข) ของ *Kluyveromyces marxianus* TISTR5116 (Y6)



ก ข

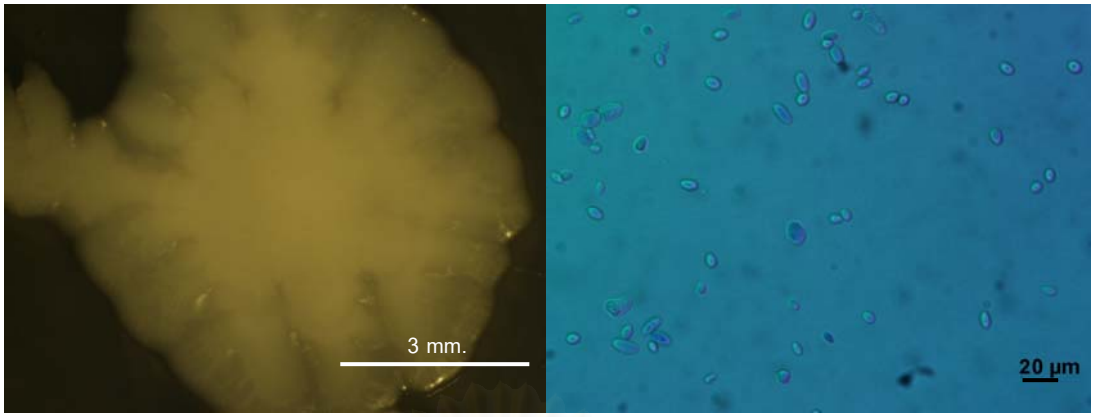
รูปที่ 4.4 ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง YM (ก) และลักษณะรูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า (ข) ของ *Debaryomyces hansenii* TISTR5155 (Y9)



ก ข

รูปที่ 4.5 ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง YM (ก) และลักษณะรูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า (ข) ของ *Candida parapsilosis* (F17)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ก ข

รูปที่ 4.6 ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง YM (ก) และลักษณะรูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า (ข) ของ *Candida krusei* (F18)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.5 ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตบีตากลูแคนในระดับขวดเขย่า

4.5.1 แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตบีตากลูแคน

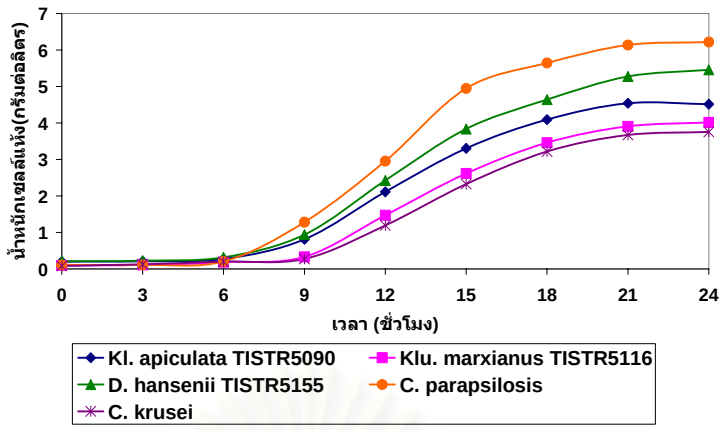
ศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตบีตากลูแคน โดยการเลี้ยงยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์ได้แก่ *Kloeckera apiculata* TISTR5090 (Y5) *Kluyveromyces marxianus* TISTR5116 (Y6) *Debaryomyces hansenii* TISTR5155 (Y9) *Candida parapsilosis* (F17) และ *Candida krusei* (F18) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM ที่แปรผันแหล่งคาร์บอนต่างกัน 3 ชนิดได้แก่ กลูโคส ซูโครสและกากน้ำตาล (ภาคผนวก ข) โดยใช้ความเข้มข้น 1% น้ำหนักต่อปริมาตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุกๆ 3 ชั่วโมง มาวัดการเจริญตามวิธีในข้อ 3.3.6.1 ปริมาณสารตั้งต้นในข้อ 3.3.6.2 และปริมาณกลูแคนในข้อ 3.3.7 พบว่ายีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์มีการเจริญได้ดีเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส ซูโครสและกากน้ำตาลตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.7 4.8 และ 4.9

และจากตารางที่ 4.6 เมื่อพิจารณาค่าอัตราการเจริญจำเพาะพบว่ามีค่าใกล้เคียงกันในยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์รวมถึงแหล่งคาร์บอนทั้ง 3 ชนิดด้วย แต่เมื่อมาพิจารณาที่ค่า บีตากลูแคนที่ผลิตได้จะเห็นว่าเมื่อใช้ 1% กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ยีสต์ทุกสายพันธุ์จะให้ปริมาณบีตากลูแคนมากกว่าใช้ซูโครสและกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน เช่นเดียวกับการศึกษาของ Aguilar และ Francois (2003) นั่นคือ เมื่อเลี้ยง *Saccharomyces cerevisiea* ในแหล่งคาร์บอนที่ต่างกันได้แก่ กลูโคส ซูโครส มอลโตส กาแลคโตสและเอทานอล พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งมากที่สุดเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน รองมาคือกาแลคโตส ซูโครส มอลโตสและเอทานอลตามลำดับและให้ปริมาณบีตากลูแคน 62.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยที่สายพันธุ์ *Candida parapsilosis* เมื่อใช้ 1% กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนมีปริมาณบีตากลูแคนถึง 120 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง และเมื่อพิจารณาที่ยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์ จะเห็นว่า *Candida parapsilosis* เป็นสายพันธุ์ที่มีแนวโน้มการเจริญที่ดีที่สุด รองลงมาคือ *Debaryomyces hansenii* TISTR5155 *Kloeckera apiculata* TISTR5090 *Kluyveromyces marxianus* TISTR5116 และ *Candida krusei* ตามลำดับ

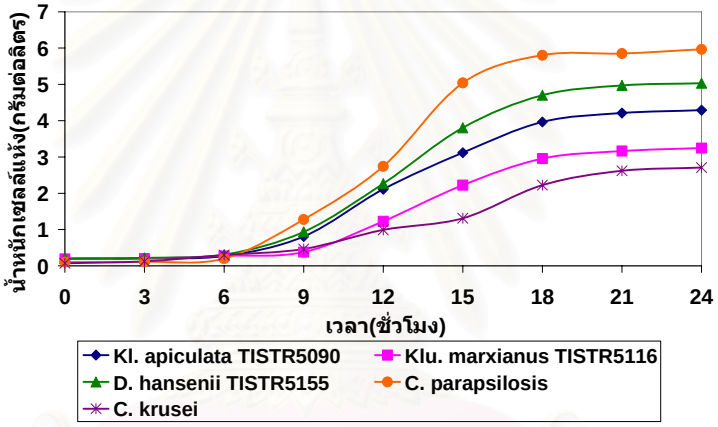
แต่จะเห็นว่าสายพันธุ์ *Kluyveromyces marxianus* TISTR5116 และ *Candida krusei* มีการเจริญที่ต่ำกว่ายีสต์อีก 3 สายพันธุ์และเมื่อดูค่า productivity ก็พบว่ามีค่าต่ำกว่ายีสต์อีก 3 สายพันธุ์มากในแหล่งคาร์บอนทุกชนิด ดังแสดงในตารางที่ 4.6

ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและเลือกยีสต์เพียง 3 สายพันธุ์ คือ *Candida parapsilosis* *Debaryomyces hansenii* TISTR5155 และ *Kloeckera apiculata* TISTR5090 เพื่อใช้ในการทดลองต่อไปเนื่องมาจากยีสต์สายพันธุ์ *Kluyveromyces marxianus* TISTR5116 และ *Candida krusei* ให้ปริมาณบีตากลูแคนต่ำกว่ามากไม่ว่าจะใช้แหล่งคาร์บอนชนิดใด

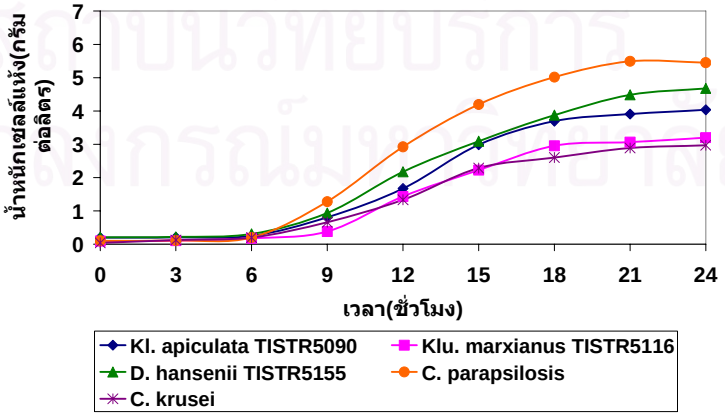
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.7 น้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ทั้ง 5 ชนิด เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้ 1% กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน



รูปที่ 4.8 น้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ทั้ง 5 ชนิด เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้ 1% ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน



รูปที่ 4.9 น้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ทั้ง 5 ชนิด เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้ 1% กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางที่ 4.6 แสดงผลการทดลองการแปรผันแหล่งคาร์บอนในการผลิตบีตากลูแคน

แหล่งคาร์บอน	**1%กลูโคส**					**1%ซูโครส**					**1%กากน้ำตาล**				
สายพันธุ์ยีสต์	*Kloeckera apiculata* TISTR5090	*Kluyveromyces marxianus* TISTR5116	*Debaryomyces hansenii* TISTR5155	*Candida parapsilosis*	*Candida krusei*	*Kloeckera apiculata* TISTR5090	*Kluyveromyces marxianus* TISTR5116	*Debaryomyces hansenii* TISTR5155	*Candida parapsilosis*	*Candida krusei*	*Kloeckera apiculata* TISTR5090	*Kluyveromyces marxianus* TISTR5116	*Debaryomyces hansenii* TISTR5155	*Candida parapsilosis*	*Candida krusei*
น้ำหนักเซลล์แห้ง* (กรัมต่อลิตร)	4.514	4.014	5.456	6.218	3.755	4.291	3.247	5.032	5.965	2.709	4.035	3.199	4.678	5.451	2.969
บีตากลูแคน* (กรัมต่อลิตร)	0.511	0.282	0.618	0.747	0.257	0.405	0.221	0.517	0.597	0.165	0.275	0.188	0.394	0.383	0.171
อัตราการเจริญจำเพาะ (μ)	0.110	0.123	0.108	0.118	0.126	0.105	0.126	0.102	0.115	0.125	0.112	0.121	0.096	0.090	0.111
Yx/s	0.280	0.077	0.274	0.564	0.164	0.231	0.069	0.272	0.533	0.148	0.221	0.049	0.246	0.464	0.155
Productivity (**กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง**)	0.021	0.012	0.026	0.031	0.011	0.004	0.009	0.015	0.025	0.006	0.011	0.007	0.016	0.016	0.007

*น้ำหนักเซลล์แห้งและบีตากลูแคนที่แสดงวัดจากชั่วโมงที่มีปริมาณมากที่สุด คือที่ 24 ชั่วโมง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

51

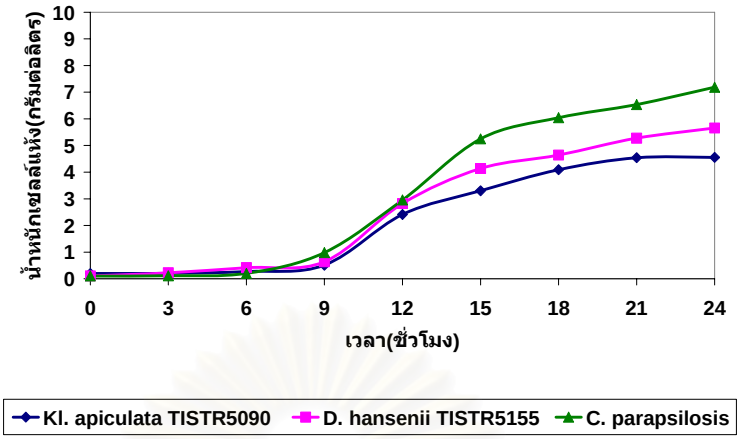
4.5.2. ปริมาณคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตบีตากลูแคน

จากการทดลองข้างต้นได้เลือกยีสต์ *Kloeckera apiculata* TISTR5090 *Debaryomyces hansenii* TISTR5155 และ *Candida parapsilosis* มาหาปริมาณกลูโคสที่เหมาะสมสำหรับการผลิตบีตากลูแคน โดยทำการแปรผันความเข้มข้นของกลูโคสเป็น 1% 5% และ 10% น้ำหนักต่อปริมาตรและเลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุกๆ 3 ชั่วโมง มาวัดการเจริญตามวิธีในข้อ 3.3.6.1 ปริมาณสารตั้งต้นในข้อ 3.3.6.2 และปริมาณบีตากลูแคนในข้อ 3.3.7

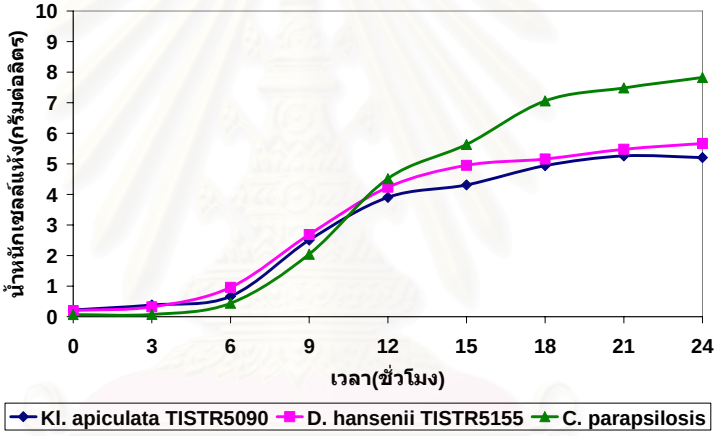
ซึ่งผลการทดลองนั้นพบว่า ยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์มีรูปแบบการเจริญที่คล้ายกันแต่ *C. parapsilosis* จะเจริญได้ดีกว่า *D. hansenii* TISTR5155 และ *Kl. apiculata* TISTR5090 ตามลำดับ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นกลูโคสขึ้นจาก 1% ยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์มีการเจริญเพิ่มขึ้นเมื่อเลี้ยงในกลูโคส 5%และ10% ดังแสดงในรูปที่ 4.10 4.11 และ 4.12 ตามลำดับ และจากตารางที่ 4.7 เมื่อพิจารณาปริมาณบีตากลูแคนที่ได้จะเห็นว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคส ยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์ให้ปริมาณบีตากลูแคนเพิ่มขึ้นด้วย

เมื่อพิจารณาที่อัตราการเจริญจำเพาะของยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์ในความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนทั้ง 3 พบว่ามีอัตราการเจริญจำเพาะใกล้เคียงกันแต่ค่า productivity นั้นแสดงให้เห็นว่าที่กลูโคสความเข้มข้น 1% มีค่า productivity ต่ำกว่า 5% และ 10% ถึงแม้ว่าที่กลูโคส 10% จะให้ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณบีตากลูแคนมากที่สุดแต่ก็ไม่ได้แตกต่างกับกลูโคส 5% มากนัก ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกใช้กลูโคสที่ความเข้มข้น 5%ในการทำการทดลองขั้นต่อไป

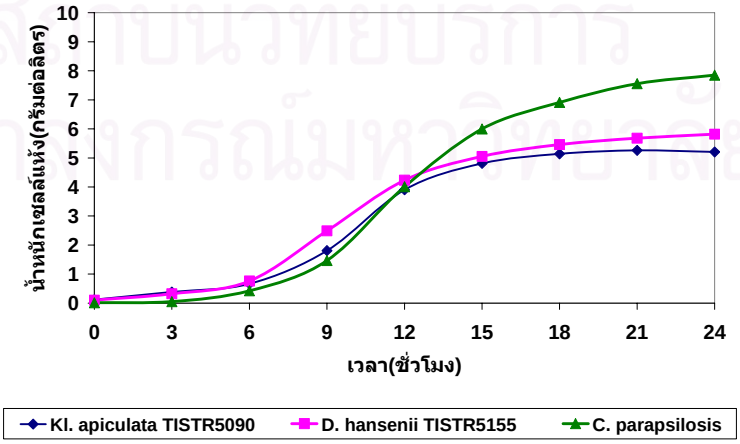
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.10 น้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ทั้ง 3 ชนิด เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้ 1% กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน



รูปที่ 4.11น้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ทั้ง 3 ชนิด เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้ 5% กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน



รูปที่ 4.12 น้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ทั้ง 3 ชนิด เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้ 10% กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางที่ 4.7 แสดงผลการทดลองการแปรผันปริมาณคาร์บอนในการผลิตบีตากลูแคน

แหล่งคาร์บอน	**1%กลูโคส**			**5%กลูโคส**			**10%กลูโคส**		
สายพันธุ์ยีสต์	*Kloeckera apiculata* TISTR5090	*Debaryomyces hansenii* TISTR5155	*Candida parapsilosis*	*Kloeckera apiculata* TISTR5090	*Debaryomyces hansenii* TISTR5155	*Candida parapsilosis*	*Kloeckera apiculata* TISTR5090	*Debaryomyces hansenii* TISTR5155	*Candida parapsilosis*
น้ำหนักเซลล์แห้ง* (กรัมต่อลิตร)	4.554	5.656	7.185	5.205	5.666	7.825	5.205	5.816	7.851
บีตากลูแคน* (กรัมต่อลิตร)	0.505	0.632	0.780	0.842	0.892	1.296	0.884	0.895	1.359
อัตราการเจริญจำเพาะ (μ)	0.088	0.082	0.104	0.090	0.102	0.110	0.101	0.110	0.091
Yx/s	0.444	0.468	0.531	0.426	0.476	0.939	0.629	0.495	0.801
Productivity (**กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง**)	0.021	0.026	0.033	0.035	0.037	0.054	0.037	0.037	0.056

*น้ำหนักเซลล์แห้งและบีตากลูแคนที่แสดงวัดจากชั่วโมงที่มีปริมาณมากที่สุด คือที่ 24 ชั่วโมง

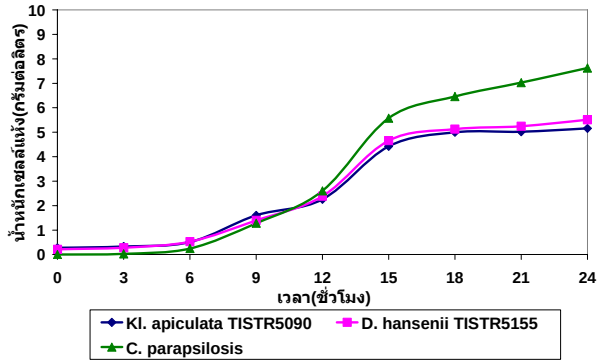
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

54

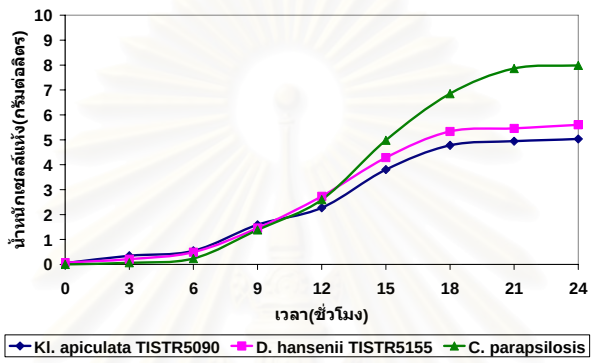
4.5.3 ปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตบีตากลูแคน

แปรผันปริมาณไนโตรเจนเพื่อการผลิตบีตากลูแคน โดยทำการแปรผันปริมาณไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งในการทดลองนี้ใช้ YM เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมีเพพโตนและสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยเลี้ยงยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์ได้แก่ *Kl. apiculata* TISTR5090 *D. hansenii* TISTR5155 และ *C. parapsilosis* โดยทำการแปรผันปริมาณและเลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุกๆ 3 ชั่วโมงมาวัดการเจริญตามวิธีในข้อ 3.3.6.1 ปริมาณสารตั้งต้นในข้อ 3.3.6.2 และปริมาณบีตากลูแคนในข้อ 3.3.7 โดยใช้กลูโคส 5% เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งเป็นปริมาณที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองที่ผ่านมา ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเมื่อแปรผันปริมาณสารสกัดจากยีสต์กับเพพโตนให้มีสัดส่วนเป็น 0.7%:0.5% 0.5%:0.5% 0.4%:0.5% 0.3%:0.5% และ 0.1%:0.5% น้ำหนักต่อปริมาตร พบว่าไม่มีผลต่อการเจริญของยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์ ดังแสดงในรูปที่ 4.13 4.14 4.15 4.16 และ 4.17 ตามลำดับ โดยที่สัดส่วนของสารสกัดจากยีสต์ต่อเพพโตนเป็น 0.3%:0.5% ยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์มีน้ำหนักเซลล์แห้งมากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณบีตากลูแคนที่ผลิตได้มากที่สุดที่สัดส่วนนี้เช่นกัน ดังแสดงในตารางที่ 4.8 และสัดส่วนของสารสกัดจากยีสต์ต่อเพพโตนที่ให้บีตากลูแคนน้อยที่สุดได้แก่ 0.1%:0.5% จากตารางที่ 4.8 ค่าอัตราการเจริญจำเพาะมีค่าใกล้เคียงกันในทุกสัดส่วน ในกรณีค่า productivity นั้นพบว่าที่ 0.3%:0.5% และ 0.4%:0.5% ให้ค่า productivity ใกล้เคียงกันและมากกว่าสัดส่วนที่ 0.5%:0.5% และ 0.7%:0.5% ตามลำดับ ค่า productivity น้อยที่สุดที่สัดส่วนของสารสกัดจากยีสต์ต่อเพพโตนเท่ากับ 0.1%:0.5%

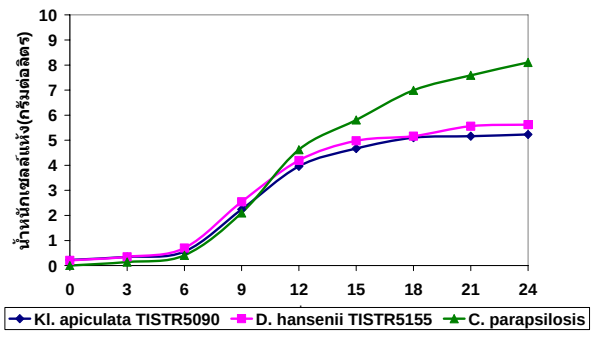
ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกสัดส่วนของสารสกัดจากยีสต์ต่อเพพโตนเป็น 0.3%:0.5% เพื่อทำการทดลองในขั้นต่อไป เนื่องมาจากเป็นสัดส่วนที่ยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์ให้ค่าบีตากลูแคนมาก ถึงแม้ว่าบีตากลูแคนที่ได้จะใกล้เคียงกับเมื่อเลี้ยงยีสต์ในอาหารที่มีสัดส่วนของสารสกัดจากยีสต์ต่อเพพโตนเป็น 0.4%:0.5% แต่ในสัดส่วนนี้จะใช้สารสกัดจากยีสต์มากกว่าจึงทำให้ค่าใช้จ่ายสูงขึ้นไปด้วย



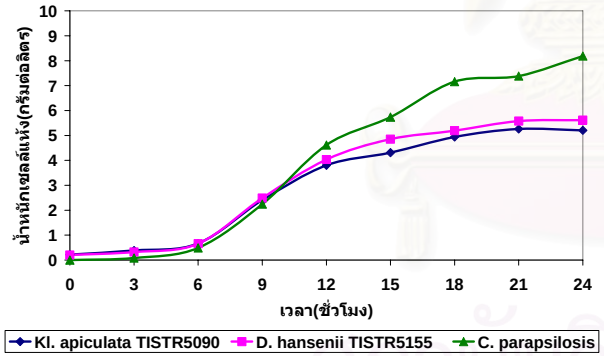
รูปที่ 4.13 น้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ทั้ง 3 ชนิดในอาหารที่มีสัดส่วนของสารสกัดจากยีสต์ต่อเพพโตนเป็น 0.7% : 0.5% เป็นแหล่งไนโตรเจน



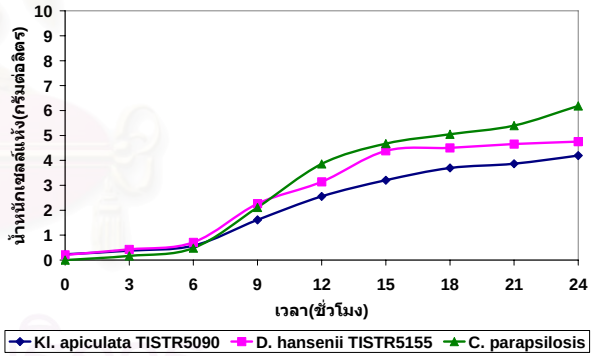
รูปที่ 4.14 น้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ทั้ง 3 ในอาหารที่มีสัดส่วนของสารสกัดจากยีสต์ต่อเพพโตนเป็น 0.5% : 0.5% เป็นแหล่งไนโตรเจน



รูป4.15น้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ทั้ง 3 ชนิดในอาหารที่มีสัดส่วนของสารสกัดจากยีสต์ต่อเพพโตนเป็น 0.4% : 0.5% เป็นแหล่งไนโตรเจน



รูป4.16 น้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ทั้ง 3 ชนิด ในอาหารที่มีสัดส่วนของสารสกัดจากยีสต์ต่อเพพโตนเป็น 0.3% : 0.5% เป็นแหล่งไนโตรเจน



รูปที่ 4.17 น้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ทั้ง 3 ชนิด ในอาหารที่มีสัดส่วนของสารสกัดจากยีสต์ต่อเพพโตนเป็น 0.1% : 0.5% เป็นแหล่งไนโตรเจน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

56

ตารางที่ 4.8 แสดงผลการทดลองการแปรผันปริมาณไนโตรเจนในการผลิตบีตากลูแคน

ปริมาณไนโตรเจน (%สารกัดจากยีสต์ : %เพพโตน) (w/v)	0.7% : 0.5%			0.5% : 0.5%			0.4% : 0.5%			0.3% : 0.5%			0.1% : 0.5%		
สายพันธุ์ยีสต์	*Kloeckera apiculata* TISTR5090	*Debaryomyces hansenii* TISTR5155	*Candida parapsilosis*	*Kloeckera apiculata* TISTR5090	*Debaryomyces hansenii* TISTR5155	*Candida parapsilosis*	*Kloeckera apiculata* TISTR5090	*Debaryomyces hansenii* TISTR5155	*Candida parapsilosis*	*Kloeckera apiculata* TISTR5090	*Debaryomyces hansenii* TISTR5155	*Candida parapsilosis*	*Kloeckera apiculata* TISTR5090	*Debaryomyces hansenii* TISTR5155	*Candida parapsilosis*
น้ำหนักเซลล์แห้ง* (กรัมต่อลิตร)	5.156	5.510	7.624	5.032	5.603	7.985	5.230	5.625	8.105	5.205	5.616	8.185	4.192	4.752	6.187
บีตากลูแคน* (กรัมต่อลิตร)	0.769	0.829	1.186	0.756	0.865	1.189	0.858	0.923	1.245	0.904	0.938	1.258	0.618	0.648	0.944
อัตราการเจริญจำเพาะ (μ)	0.132	0.127	0.151	0.117	0.111	0.161	0.122	0.111	0.169	0.137	0.114	0.156	0.114	0.110	0.132
Yx/s	0.248	0.448	0.234	0.204	0.376	0.277	0.203	0.308	0.252	0.258	0.301	0.337	0.138	0.285	0.174
Productivity **(กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)**	0.032	0.034	0.049	0.032	0.036	0.049	0.036	0.038	0.052	0.037	0.038	0.052	0.026	0.027	0.039

*น้ำหนักเซลล์แห้งและบีตากลูแคนที่แสดงวัดจากชั่วโมงที่มีปริมาณมากที่สุด คือที่ 24 ชั่วโมง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

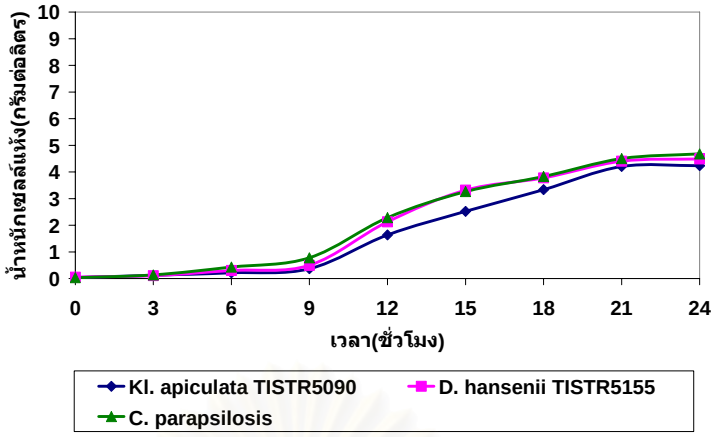
57

4.5.4 ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมในการผลิตบีตากลูแคน

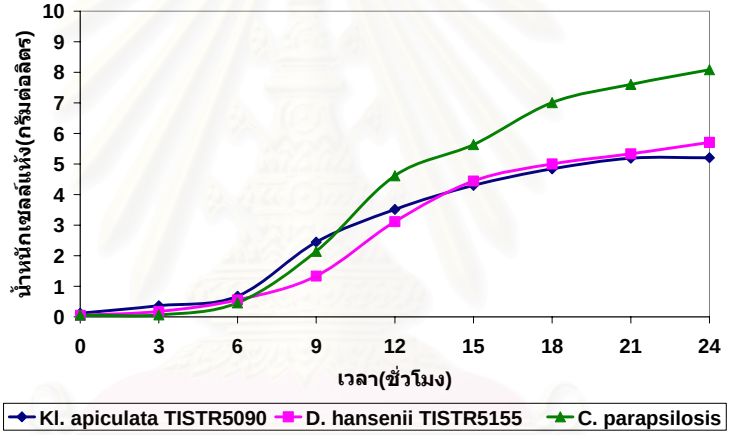
เลี้ยงยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์โดยใช้แหล่งคาร์บอนและปริมาณที่เหมาะสมรวมไปถึงปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมจากการทดลองก่อนหน้าโดยแปรผันปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นเป็น 1% 5% และ 10% โดยปริมาตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุกๆ 3 ชั่วโมงมาวัดการเจริญตามวิธีในข้อ 3.3.6.1 ปริมาณสารตั้งต้นในข้อ 3.3.6.2 และปริมาณบีตากลูแคนในข้อ 3.3.7 พบว่า เมื่อใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นเป็น 5% และ 10% นั้นยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์มีการเจริญใกล้เคียงกันและสูงกว่าเมื่อใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นเป็น 1% ดังแสดงในรูปที่ 4.18 4.19 และ 4.20 ตามลำดับ จากตารางที่ 4.9 ปริมาณบีตากลูแคน อัตราการเจริญจำเพาะและค่า productivity ก็มีแนวโน้มเช่นเดียวกับการเจริญ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ อธิปัตย์ (2550) ที่ศึกษาการผลิตบีตากลูแคนจากยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TJ3 ด้วยการเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบ air lift ในส่วนของความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นนั้น พบว่าเมื่อลดความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นลงเซลล์มีการเจริญช้าลงเช่นเดียวกับการผลิตบีตากลูแคน

ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกใช้ปริมาณกล้าเชื้อที่ 5% โดยปริมาตร เนื่องมาจากเป็นการลดค่าใช้จ่ายในการผลิตคือไม่ต้องใช้กล้าเชื้อมากถึง 10%

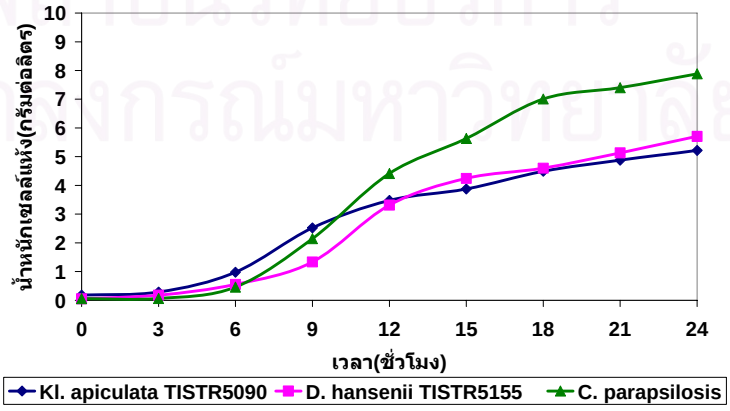
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.18 น้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ทั้ง 3 ชนิด เมื่อใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น 1%



รูปที่ 4.19 น้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ทั้ง 3 ชนิด เมื่อใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น 5%



รูปที่ 4.20 น้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ทั้ง 3 ชนิด เมื่อใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น 10%

ตารางที่ 4.9 แสดงผลการทดลองการแปรผันปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นในการผลิตบีตากลูแคน

ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น	**กล้าเชื้อ 1%**			**กล้าเชื้อ 5%**			**กล้าเชื้อ 10%**		
สายพันธุ์ยีสต์	*Kloeckera apiculata* TISTR5090	*Debaryomyces hansenii* TISTR5155	*Candida parapsilosis*	*Kloeckera apiculata* TISTR5090	*Debaryomyces hansenii* TISTR5155	*Candida parapsilosis*	*Kloeckera apiculata* TISTR5090	*Debaryomyces hansenii* TISTR5155	*Candida parapsilosis*
น้ำหนักเซลล์แห้ง* (กรัมต่อลิตร)	4.237	4.490	4.680	5.205	5.707	8.085	5.217	5.707	7.885
บีตากลูแคน* (กรัมต่อลิตร)	0.745	0.739	0.756	0.859	0.853	1.267	0.870	0.882	1.274
อัตราการเจริญจำเพาะ (μ)	0.108	0.095	0.085	0.094	0.102	0.116	0.081	0.133	0.077
Yx/s	0.306	0.352	0.352	0.558	0.638	0.667	0.400	0.615	0.662
Productivity (**กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง**)	0.031	0.031	0.032	0.036	0.036	0.053	0.036	0.037	0.053

*น้ำหนักเซลล์แห้งและบีตากลูแคนที่แสดงวัดจากชั่วโมงที่มีปริมาณมากที่สุด คือที่ 24 ชั่วโมง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

60

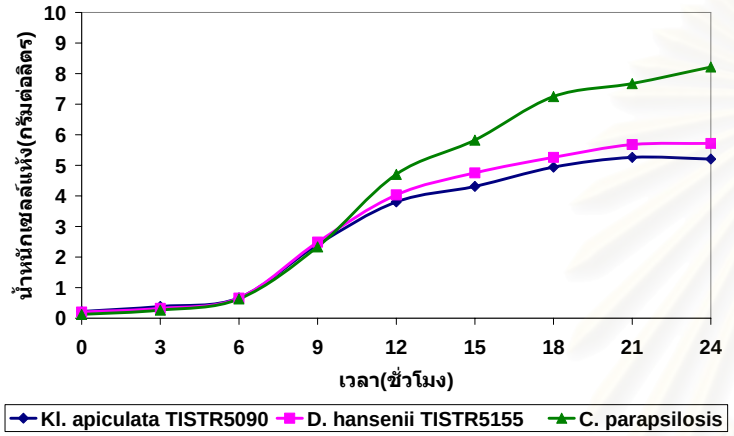
4.5.5 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตบีตากลูแคน

เลี้ยงยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์โดยใช้แหล่งคาร์บอน ไนโตรเจนและปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมจากการทดลองก่อนหน้า แปรผันอุณหภูมิเป็น 30, 33, 37 และ40 องศาเซลเซียส เลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุกๆ 3 ชั่วโมงมาวัดการเจริญตามวิธีในข้อ 3.3.6.1 ปริมาณสารตั้งต้นในข้อ 3.3.6.2 และปริมาณบีตากลูแคนในข้อ 3.3.7

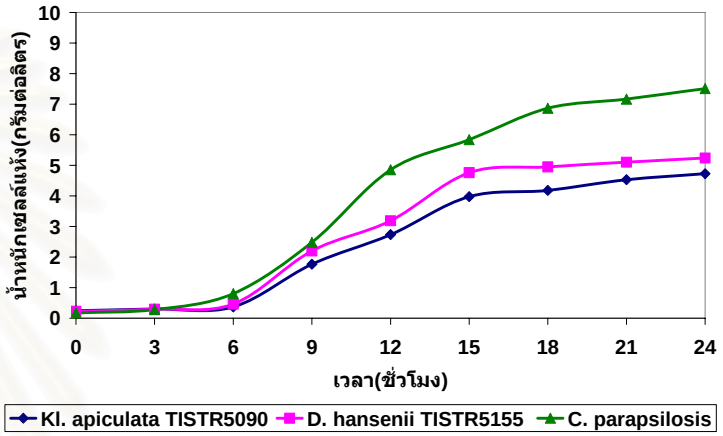
พบว่าเมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์จะมีการเจริญที่ดีที่สุดรองลงมาคือ 33และ 37 องศาเซลเซียสตามลำดับ และจะเห็นได้ว่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์มีการเจริญที่ต่ำที่สุดดังแสดงในรูปที่ 4.21 4.22 4.23 และ 4.24 ตามลำดับและเมื่อพิจารณาผลการทดลองในตารางที่ 4.10 นั้นจะพบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสให้ปริมาณบีตากลูแคนมากที่สุดสำหรับยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์ และลดลงไปเมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิเป็น 33, 37 และ40 องศาเซลเซียสตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของอธิปัตย์ (2550) ซึ่งทำการศึกษาปริมาณบีตากลูแคนจากยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TJ3 ภายใต้สภาวะการเลี้ยงที่แตกต่างกัน ในส่วนของอุณหภูมิ เมื่อเลี้ยงที่ 28 30 33 และ 35 องศาเซลเซียส พบว่าบีตากลูแคนมีปริมาณสูงที่สุดที่ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งผลิตกลูแคนได้ 1,215.3 มิลลิกรัม ซึ่งพบว่าใกล้เคียงกับปริมาณกลูแคนในการทดลองนี้คือ สายพันธุ์ *C. parapsilosis* ผลิตกลูแคนได้ 1,246 มิลลิกรัม

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการผลิตบีตา กลูแคน คือ 30 องศาเซลเซียส ผู้ทดลองจึงเลือกอุณหภูมินี้ใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

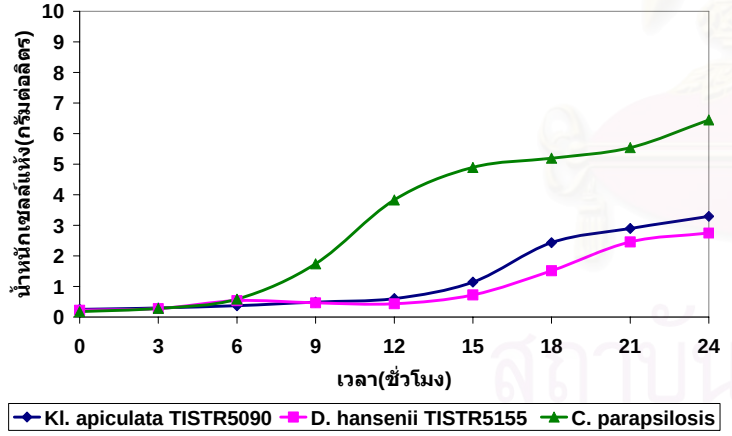
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



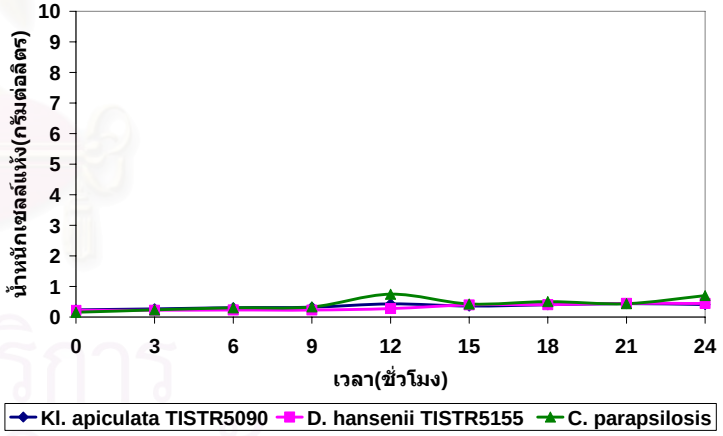
รูปที่ 4.21 น้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ทั้ง 3 ชนิดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.22 น้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ทั้ง 3 ชนิดที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.23 น้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ทั้ง 3 ชนิดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.24 น้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ทั้ง 3 ชนิดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

62

ตารางที่ 4.10 แสดงผลการทดลองการแปรผันอุณหภูมิในการผลิตบีตากลูแคน

อุณหภูมิ(องศาเซลเซียส)	30			33			37			40		
สายพันธุ์ยีสต์	*Kloeckera apiculata* TISTR5090	*Debaryomyces hansenii* TISTR5155	*Candida parapsilosis*	*Kloeckera apiculata* TISTR5090	*Debaryomyces hansenii* TISTR5155	*Candida parapsilosis*	*Kloeckera apiculata* TISTR5090	*Debaryomyces hansenii* TISTR5155	*Candida parapsilosis*	*Kloeckera apiculata* TISTR5090	*Debaryomyces hansenii* TISTR5155	*Candida parapsilosis*
น้ำหนักเซลล์แห้ง* (กรัมต่อลิตร)	5.205	5.716	8.215	4.726	5.240	7.510	3.292	2.746	6.444	0.410	0.447	0.701
บีตากลูแคน* (กรัมต่อลิตร)	0.886	0.928	1.246	0.781	0.819	1.057	0.502	0.506	0.756	-	-	-
อัตราการเจริญจำเพาะ (μ)	0.097	0.107	0.152	0.098	0.094	0.067	0.153	0.099	0.050	0.057	0.030	0.056
Yx/s	0.426	0.471	0.534	0.329	0.387	0.529	0.032	0.014	0.216	0.020	0.011	0.015
Productivity (**กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง**)	0.037	0.039	0.052	0.033	0.034	0.044	0.021	0.021	0.031	-	-	-

*น้ำหนักเซลล์แห้งและบีตากลูแคนที่แสดงวัดจากชั่วโมงที่มีปริมาณมากที่สุด คือที่ 24 ชั่วโมง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

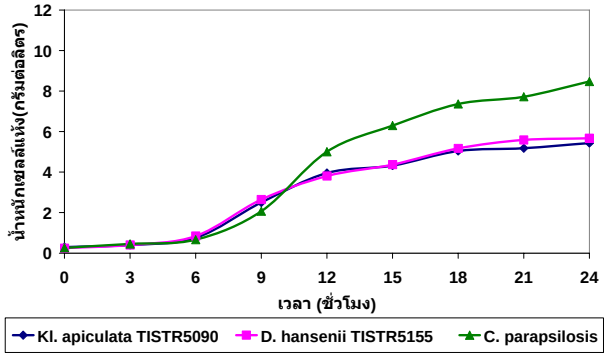
63

4.5.6 ความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมในการผลิตบีตากลูแคน

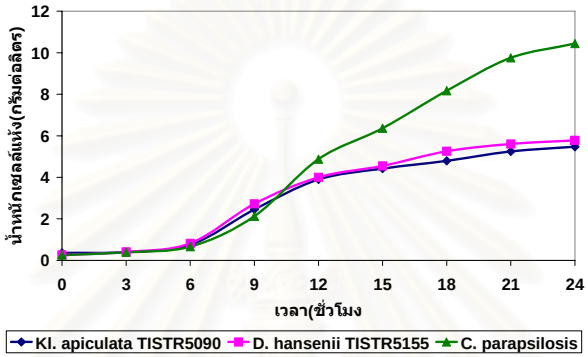
เลี้ยงยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์โดยใช้แหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น และอุณหภูมิที่เหมาะสม แต่แปรผันค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นตั้งแต่ 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 และ 7.0 เลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุกๆ 3 ชั่วโมงมาวัดการเจริญตามวิธีในข้อ 3.3.6.1 ปริมาณสารตั้งต้นในข้อ 3.3.6.2 และปริมาณบีตากลูแคนในข้อ 3.3.7

พบว่าแนวโน้มของการเจริญยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์เป็นไปในทิศทางเดียวกันในทุกค่าความเป็นกรดเบส นั่นคือ *C. parapsilosis* จะมีการเจริญที่ดีที่สุดรองมาคือ *D. hansenii* TISTR5155 และ *Kl. apiculata* TISTR5090 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.25 4.26 4.27 4.28 และ 4.29 ซึ่งหากพิจารณาจากผลการทดลองในตารางที่ 4.11 นั้นจะพบว่าในค่าความเป็นกรดเบสที่ 4.5 5.0 และ 5.5 นั้นจะให้ปริมาณบีตากลูแคนมากกว่าที่ค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 6.0 และ 7.0 แต่เมื่อมาพิจารณาที่ค่า productivity แล้วนั้นจะเห็นว่า ที่ค่าความเป็นกรดเบส 5.0 ยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์จะมีค่า productivity มากที่สุด มีการศึกษาของ Aguilar และ Francois (2003) ที่ศึกษาองค์ประกอบของผนังเซลล์เมื่อเลี้ยงในภาวะต่างๆ ในส่วนของค่าความเป็นกรดเบสเมื่อเลี้ยงที่ 3.0 4.0 5.0 6.0 พบว่าที่ 5.0 ให้น้ำหนักเซลล์แห้งมากที่สุดแต่ปริมาณบีตากลูแคนสูงสุดที่ 4.0 เท่ากับ 80.8 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งน้อยกว่าผลการทดลองในครั้งนี้คือที่ค่าความเป็นกรดเบส 5.0 สายพันธุ์ *C. parapsilosis* มีปริมาณบีตากลูแคนสูงถึง 157 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง ดังนั้นค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นที่ 5.0 จึงเป็นค่าที่เหมาะสมในการผลิตบีตากลูแคนสำหรับยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์นี้

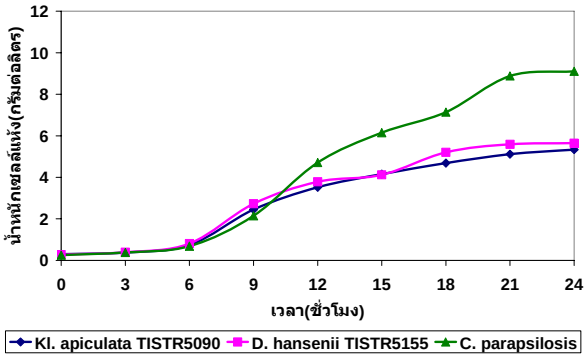
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



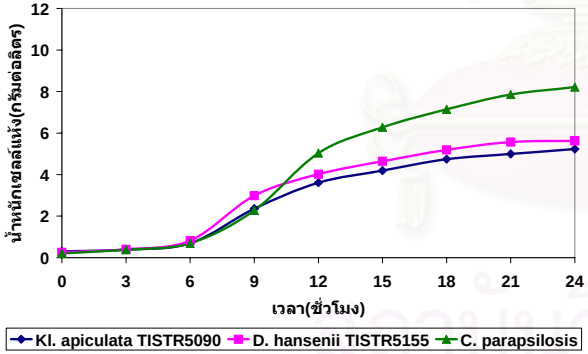
รูปที่ 4.25 น้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ทั้ง 3 ชนิด เมื่อค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นเป็น 4. 5



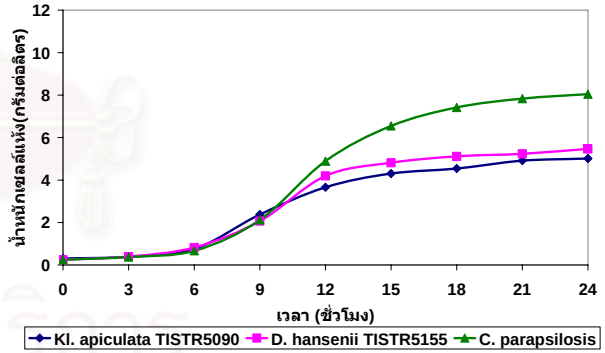
รูปที่ 4.26 น้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ทั้ง 3 ชนิด เมื่อค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นเป็น 5.0



รูปที่ 4.27 น้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ทั้ง 3 ชนิด เมื่อค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นเป็น 5.5



รูปที่ 4.28 น้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ทั้ง 3 ชนิด เมื่อค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นเป็น 6.0



รูปที่ 4.29 น้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ทั้ง 3 ชนิด เมื่อค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นเป็น 7.0

ตารางที่ 4.11 แสดงผลการทดลองการแปรผันค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นในการผลิตบีตากลูแคน

ความเป็นกรดเบส	4.5			5.0			5.5			6.0			7.0		
สายพันธุ์ยีสต์	*Kloeckera apiculata* TISTR5090	*Debaryomyces hansenii* TISTR5155	*Candida parapsilosis*	*Kloeckera apiculata* TISTR5090	*Debaryomyces hansenii* TISTR5155	*Candida parapsilosis*	*Kloeckera apiculata* TISTR5090	*Debaryomyces hansenii* TISTR5155	*Candida parapsilosis*	*Kloeckera apiculata* TISTR5090	*Debaryomyces hansenii* TISTR5155	*Candida parapsilosis*	*Kloeckera apiculata* TISTR5090	*Debaryomyces hansenii* TISTR5155	*Candida parapsilosis*
น้ำหนักเซลล์แห้ง* (กรัมต่อลิตร)	5.437	5.671	8.476	5.473	5.783	10.443	5.337	5.646	9.108	5.232	5.623	8.212	5.014	5.467	8.045
บีตากลูแคน* (กรัมติอลิตร)	0.896	1.019	1.337	0.938	1.058	1.648	0.880	0.978	1.437	0.836	0.974	1.246	0.827	0.087	1.169
อัตราการเจริญจำเพาะ (μ)	0.091	0.084	0.186	0.098	0.085	0.182	0.088	0.068	0.175	0.069	0.073	0.169	0.099	0.140	0.187
Yx/s	0.153	0.116	0.485	0.145	0.159	0.402	0.237	0.128	0.384	0.163	0.179	0.503	0.169	0.254	0.464
Productivity (**กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง**)	0.037	0.042	0.056	0.039	0.044	0.069	0.036	0.041	0.059	0.036	0.041	0.034	0.034	0.036	0.049

*น้ำหนักเซลล์แห้งและบีตากลูแคนที่แสดงวัดจากชั่วโมงที่มีปริมาณมากที่สุด คือที่ 24 ชั่วโมง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

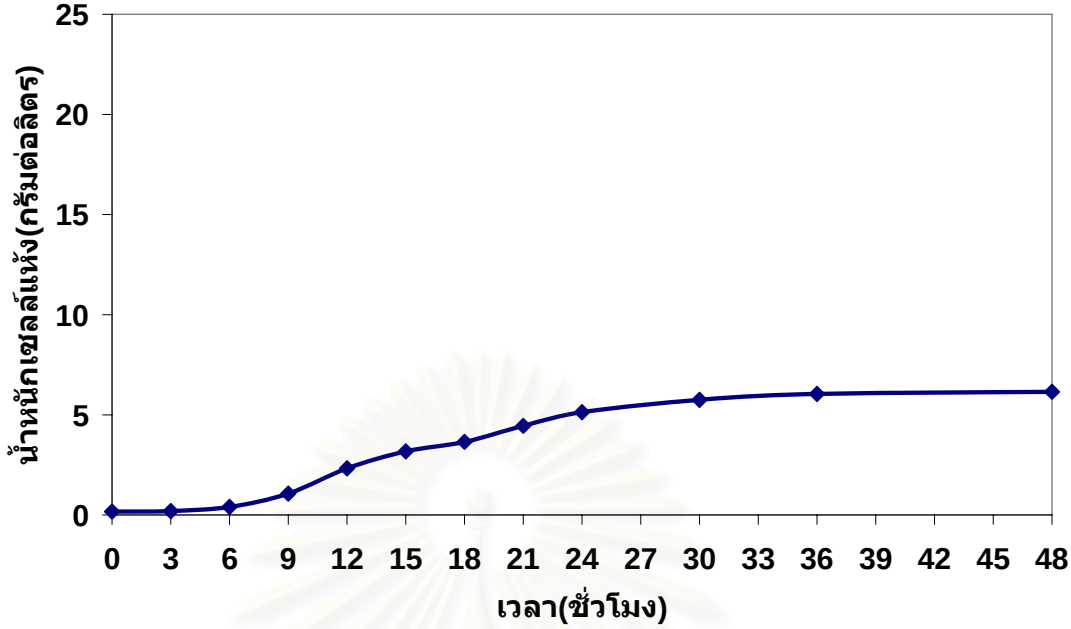
4.6 การศึกษาการผลิตบีตากลูแคนในถังหมักแบบกะ

เลือกยีสต์จากการทดลองก่อนหน้าคือข้อ 4.4 โดยเลือกมา 2 สายพันธุ์ ที่มีความเหมาะสมในการผลิตบีตากลูแคนมากที่สุดก็คือ สายพันธุ์ *Candida parapsilosis* และรองลงมาคือ *Debaryomyces hansenii* TISTR5155

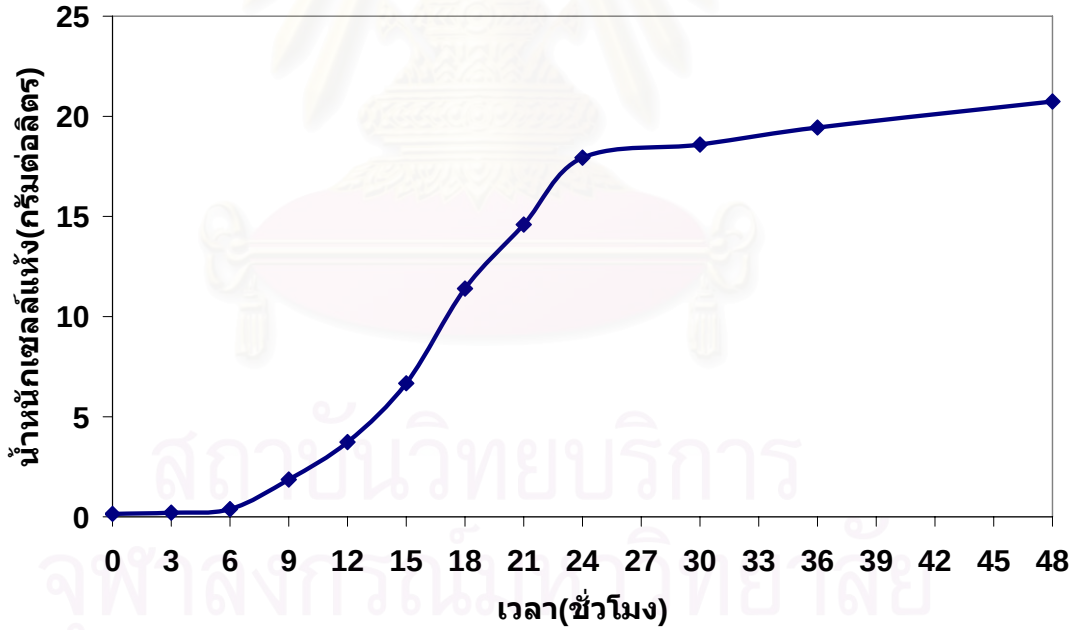
การผลิตบีตากลูแคนในถังหมักนั้นทำได้โดยการใช้ภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองก่อนหน้านั่นคือ ใช้ 5% กลูโคสน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นแหล่งคาร์บอน โดยใช้สัดส่วนของสารสกัดจากยีสต์ต่อเพพโตนเป็น 0.3% : 0.5% น้ำหนักต่อปริมาตร โดยใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นเป็น 5% โดยปริมาตร ค่าความเป็นกรดเบสควบคุมให้อยู่ที่ 5.0 ตลอดการทดลอง และใช้อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุกๆ 3 ชั่วโมงมาวัดการเจริญตามวิธีในข้อ 3.3.6.1 ปริมาณสารตั้งต้นในข้อ 3.3.6.2 และปริมาณบีตากลูแคนในข้อ 3.3.7

ซึ่งผลการทดลองจะพบว่าเมื่อทำการเลี้ยงยีสต์สายพันธุ์*D. hansenii* TISTR5155 และ *C. parapsilosis* ในถังหมักนั้นพบว่ามีการเจริญที่สูงขึ้นมากโดยจะเห็นว่ามีน้ำหนักเซลล์แห้งมากขึ้นกว่าเดิมดังแสดงในรูปที่ 4.30 และ 4.31

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.30 น้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์สายพันธุ์ *D. hansenii* TISTR5155 เมื่อเลี้ยงในถังหมักแบบกะ



รูปที่ 4.31 น้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์สายพันธุ์ *C. parapsilosis* เมื่อเลี้ยงในถังหมักแบบกะ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.12 แสดงผลการทดลองในการเลี้ยงยีสต์ *D. Hansenii* TISTR5155 และ *C. parapsilosis* ในถังหมักแบบกะ

สายพันธุ์ยีสต์	*D. hansenii* TISTR5155	*C. parapsilosis*
น้ำหนักเซลล์แห้ง* (กรัมต่อลิตร)	6.722	20.743
บีตากลูแคน* (กรัมต่อลิตร)	1.237	3.198
อัตราการเจริญจำเพาะ (μ)	0.191	0.213
Yx/s	0.257	0.289
Productivity (**กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง**)	0.026	0.066

*น้ำหนักเซลล์แห้งและบีตากลูแคนที่แสดงวัดจากชั่วโมงที่มีปริมาณมากที่สุด คือที่ 48 ชั่วโมง

โดยเฉพาะสายพันธุ์ *C. parapsilosis* มีการเพิ่มจำนวนของน้ำหนักเซลล์แห้งสูงขึ้นมาก จาก 10.443 กรัมเป็น 20.743 กรัม และปริมาณบีตากลูแคนก็สูงขึ้นจาก 1.648 กรัมเป็น 3.198 กรัม ซึ่งสามารถบอกได้ว่า ยีสต์สายพันธุ์ *C. parapsilosis* ตอบสนองต่อ การเลี้ยงในถังหมักมากกว่าสายพันธุ์ *D. hansenii* TISTR5155 คือมีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงขึ้น 1.9 เท่า อัตราการเจริญจำเพาะสูงขึ้น 1.17

และจากการศึกษาการผลิตบีตากลูแคนในถังหมักที่ผ่านมาพบว่า Kim และ Yun (2003) ศึกษาการผลิตบีตากลูแคนที่ละลายน้ำได้โดยใช้ *Saccharomyces cerevisiea* KCTC7913 พบว่ามีปริมาณบีตากลูแคน 0.13 กรัมบีตากลูแคนต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และมีอัตราการผลิตที่ 0.095 กรัมบีตากลูแคนต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งผลการทดลองในครั้งนี้ พบว่าสายพันธุ์ *C. parapsilosis* ให้ปริมาณบีตากลูแคนสูงสุดที่ 0.15 กรัมบีตากลูแคนต่อน้ำหนักเซลล์แห้งแต่มีอัตราการผลิตที่ต่ำกว่าคือ 0.066 กรัมบีตากลูแคนต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งอาจเป็นผลมาจาก การทดลองของ Kim และ Yun (2003) ใช้การเลี้ยงแบบกึ่งกะ (fed-batch fermentation) ซึ่งอาจจะทำให้ได้ผลผลิตในเวลาที่เร็วกว่า

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการศึกษาของ อธิปัตย์ (2550) ที่ศึกษาการผลิตบีตากลูแคนโดย *Saccharomyces cerevisiea* TJ3 โดยใช้ถังหมักแบบ air lift พบว่าเมื่อใช้แหล่งอาหารและภาวะที่เหมาะสมเลี้ยงแบบกะ (batch fermentation) พบมีปริมาณบีตากลูแคน 783.3 มิลลิกรัม แต่เมื่อเลี้ยงแบบกึ่งกะบีตากลูแคนเพิ่มขึ้นเป็น 1,165.4 มิลลิกรัม และใช้เวลาในการผลิต 20 ชั่วโมง ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ยีสต์สายพันธุ์ *C. parapsilosis* ให้ปริมาณบีตากลูแคนสูงสุดที่ 1,906 มิลลิกรัม แต่ใช้เวลาถึง 48 ชั่วโมง ซึ่งหากเทียบที่เวลาเท่ากันคือ 20 ชั่วโมง *Candida parapsilosis* จะมีปริมาณบีตากลูแคน 1,335 มิลลิกรัม จากผลการทดลองจะพบว่ายีสต์สายพันธุ์ *C. parapsilosis* นั้นมีความเหมะสมในการผลิตบีตากลูแคนและมีความเหมาะสมสำหรับการนำไปศึกษาเพิ่มเติมเพื่อผลิตบีตากลูแคนให้ได้ปริมาณสูงขึ้นเพื่อใช้ประโยชน์ในด้านอุตสาหกรรมต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

การคัดแยกยีสต์จากดินและผลไม้สุกจากแหล่งต่างๆ จำนวน 55 ตัวอย่าง โดยเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YM ที่ปรับให้ค่าความเป็นกรดเบสเป็น 4.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 24-48 ชั่วโมง สามารถคัดแยกยีสต์ได้ 127 สายพันธุ์ ซึ่งได้ทำการคัดเลือกยีสต์ที่มีลักษณะทางสันฐานวิทยาที่ต่างกันและเจริญได้เร็วที่สุดจากดิน 10 สายพันธุ์และจากผลไม้ 10 สายพันธุ์ เพื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณบีตากลูแคน ร่วมกับยีสต์ที่ทราบสายพันธุ์แล้วจากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) จำนวน 20 สายพันธุ์

นำยีสต์ทั้ง 40 สายพันธุ์ มาวิเคราะห์ปริมาณบีตากลูแคนเพื่อคัดเลือกยีสต์ที่ให้ปริมาณบีตากลูแคนมากที่สุด 5 สายพันธุ์ พบว่ายีสต์ที่ให้ปริมาณบีตากลูแคนออกมามากที่สุด ได้แก่ *Debaryomyces hansenii* TISTR5155 *Kluyveromyces marxianus* TISTR5116 *Candida parapsilosis* *Kloeckera apiculata* TISTR5090 และ *Candida krusei* ตามลำดับ โดยให้ปริมาณบีตากลูแคนออกมา 0.65 0.62 0.61 0.59 และ 0.58 มิลลิกรัม ตามลำดับ

สำหรับการหาภาวะเหมาะสมของในการผลิตบีตากลูแคน เมื่อทำการศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม โดยการเลี้ยงยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM ที่แปรผันแหล่งคาร์บอนต่างกัน 3 ชนิดได้แก่ กลูโคส ซูโครสและกากน้ำตาล พบว่ายีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์มีการเจริญได้ดีและมีปริมาณบีตากลูแคนสูง เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส ซูโครสและกากน้ำตาลตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามยีสต์สายพันธุ์ *Kluyveromyces marxianus* TISTR5116 และ *Candida krusei* ให้ปริมาณบีตากลูแคนต่ำกว่ามากไม่ว่าจะใช้แหล่งคาร์บอนชนิดใด จึงเลือกยีสต์อีก 3 สายพันธุ์ที่เหลือเท่านั้นสำหรับการทดลองต่อไป

เมื่อแปรผันปริมาณกลูโคสที่เหมาะสมในการผลิตบีตากลูแคน เป็น 1% 5% และ 10% น้ำหนักต่อปริมาตร พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นกลูโคส 1% เป็นแหล่งคาร์บอนยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์มีการเจริญต่ำกว่าเมื่อเลี้ยงในกลูโคส 5% และ10% เช่นเดียวกับปริมาณบีตากลูแคนคือเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคส ยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์ให้ปริมาณบีตากลูแคนเพิ่มขึ้นด้วยแต่จะพบว่าที่กลูโคส 5% ให้ปริมาณบีตากลูแคนที่ไม่แตกต่างกับที่กลูโคส 10% ดังนั้นกลูโคส 5% จึงเป็นปริมาณที่เหมาะสมสำหรับการผลิตบีตากลูแคน

สำหรับแหล่งไนโตรเจนเมื่อแปรผันปริมาณสารสกัดจากยีสต์กับเพพโตนให้มีสัดส่วนเป็น 0.7%:0.5% 0.5%:0.5% 0.4%:0.5% 0.3%:0.5% และ 0.1%:0.5% น้ำหนักต่อปริมาตร พบว่าไม่มีผลต่อการเจริญของยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์ โดยที่สัดส่วนของสารสกัดจากยีสต์ต่อเพพโตนเป็น 0.3%:0.5% ยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์มีน้ำหนักเซลล์แห้งมากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณบีตากลูแคนที่ผลิตได้มากที่สุดที่สัดส่วนนี้เช่นกัน

การแปรผันปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นเพื่อผลิตบีตากลูแคน โดยใช้ปริมาณกล้าเชื้อเป็น 1% 5% และ 10% โดยปริมาตร พบว่าเมื่อใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นเป็น 5% และ 10% นั้นยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์มีปริมาณบีตากลูแคนและการเจริญใกล้เคียงกันและสูงกว่าเมื่อใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นเป็น 1% ดังนั้นปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น 5% จึงเหมาะสมสำหรับการผลิตบีตากลูแคนเพราะเป็นการลดค่าใช้จ่ายในการผลิต

การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตบีตากลูแคนนั้น ทำการแปรผันอุณหภูมิเป็น 30, 33, 37 และ40 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์จะมีการเจริญที่ดีที่สุดรองลงมาคือ 33 และ 37 องศาเซลเซียสตามลำดับ และที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์มีการเจริญที่ต่ำที่สุด เช่นเดียวกันกับปริมาณบีตากลูแคนคือจะมากที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสสำหรับยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์และลดลงเมื่ออุณหภูมิเป็น 33, 37 และ40 องศาเซลเซียสตามลำดับ

เมื่อแปรผันค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นตั้งแต่ 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 และ 7.0 พบว่าแนวโน้มของการเจริญยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์เป็นไปในทิศทางเดียวกันในทุกค่าความเป็นกรดเบส นั่นคือ *Candida parapsilosis* จะมีการเจริญที่ดีที่สุดรองมาคือ *Debaryomyces hansenii* TISTR5155 และ *Kloeckera apiculata* TISTR5090 ตามลำดับ สำหรับปริมาณบีตากลูแคนพบว่าที่ค่าความเป็นกรดเบส 4.5 5.0 และ 5.5 นั้นจะให้ปริมาณบีตากลูแคนมากกว่าที่ค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 6.0 และ 7.0 แต่จะพบว่าที่ค่าความเป็นกรดเบส 5.0 เป็นค่าที่เหมาะสมในการผลิตบีตากลูแคนสำหรับเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์เนื่องจากมีค่า productivity สูงที่สุด

สำหรับการผลิตบีตากลูแคนในถังหมักนั้น เลือกยีสต์สายพันธุ์ *Debaryomyces hansenii* TISTR5155 และ *Candida parapsilosis* มาทำการศึกษาเนื่องจากให้ปริมาณบีตากลูแคนมากกว่า Y5 โดยทำการเลี้ยงแบบกะและใช้ภาวะที่เหมาะสมจากการ ทดลองก่อนหน้านั่นคือ ใช้ 5% กลูโคสน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นแหล่งคาร์บอน ใช้สัดส่วนของสารสกัดจากยีสต์ต่อเพพโตนเป็น 0.3% : 0.5% น้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นเป็น 5% โดยปริมาตร ค่าความเป็นกรดเบสควบคุมให้อยู่ที่ 5.0 ตลอดการทดลอง และใช้อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

พบว่ายีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์ให้ปริมาณบีตากลูแคนที่สูงขึ้นจากการเลี้ยงระดับขวดเขย่าโดยที่สายพันธุ์ *Debaryomyces hansenii* TISTR5155 เพิ่มจาก 1.06 เป็น 1.24 กรัมต่อลิตร และสำหรับสายพันธุ์ *Candida parapsilosis* ปริมาณบีตากลูแคนเพิ่มจาก 1.65 เป็น 3.19 กรัมต่อลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้อเสนอแนะ

1.ควรศึกษาถึงแหล่งอาหารและแหล่งวิตามินที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มผลผลิตให้มากขึ้น นอกจากนี้ควรศึกษาการใช้วัตถุดิบเหลือใช้ทางการเกษตรมาใช้เป็นแหล่งอาหารเพื่อเป็นการลดต้นทุนในการผลิต

2.ควรศึกษา ลักษณะของบีตากลูแคนที่ผลิตได้ เช่น ความบริสุทธิ์ หาน้ำหนักโมเลกุล เป็นต้น เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำบีตากลูแคนไปประยุกต์ใช้งานหรืออุตสาหกรรมต่างๆ

3. ควรศึกษาเพิ่มเติมถึงปัจจัยในการผลิตในระดับถังหมัก ได้แก่ การกวน การให้อากาศ รูปแบบการเลี้ยง เช่นแบบกึ่งกะ แบบต่อเนื่อง เพื่อเพิ่มผลิตให้มากขึ้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

ภาษาไทย

สำนักนวัตกรรมแห่งชาติ. 2549. ยีสต์คุณประโยชน์ในอุตสาหกรรม. กรุงเทพมหานคร: งานส่งเสริมภาพลักษณ์องค์กร.

อธิปัตย์ คลังบุญครอง. 2550. การผลิตบีตากลูแคนจากยีสต์โดยการเพาะเลี้ยงในถังหมักระบบอากาศลอยตัว. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ภาษาอังกฤษ

Aguilar-Uscanga, B. and J.M., Francois. 2003. A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. Lett Appl Microbiol. 37:268-274.

Babineau, T.J., A. Hackford and A. Kenler. 1994. A phase II multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled study of three dosages of an immunomodulator (PGG-glucan) in high-risk surgical patients. Arch. Surg. 129: 1204-1210.

Bohn, J.A. and J.N. BeMiller. 1995. (1,3)-D-glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. Carbohyd. Polym. 28: 3-14.

Burrows, S. 1970. Baker's Yeast. In Rose, A.H., and Harrison, J.S. (eds.). The Yeasts, vol.3. pp. 349-420. London: Acedemic Press

Campbell, B. and J.H. Duffus. 1988. Yeast: A Practical Approach. 3rd ed., Department of Brewing and Biological Science,Heriot-Watt University,Edinburgh EH1 1HX.,UK.

Chorvatovicova, D., Z. Kovacikova, J. Sandula and J. Navarova. 1993. Protective effect of sulfoethylglucan against hexavalent cheomium. Mutation Res. 302: 207-211

Engstad-Rolf, E., B. Robertsen and E. Frivold. 1992. Yeast glucan induce increase in lysozyme and complement mediated haemolytic activity in Atlantic salmon blood. Fish & Shellfish immunol. 2: 287-297.

Finn, R.K. 1967. Agitation and Aeration. Biochem. Biol. Eng. Sci. 1: 69-99.

Fleet, G.H. 1991. Cell walls. In: Rose A.H., Harrison J.S. (eds.). The Yeasts, 2nd ed., vol.4. pp. 194-277. London: Academic Press.

Flieger, M., M. Kantorova, T. Benesova, S. Pazoutova and J. Votruba. 2003. Kinetic of soluble glucan production by *Claviceps viridis*. Folia. Microbiol. 48(5): 633-638.

Freimund, S., M. Suater, O. Kappeli and H. Dutler. 2003. A new non-degrading isolation process for 1,3-β-D-glucan of high purity from baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Carbohydr. Polymers. 54: 159-171.

Hofer, M., M. Pospisil, I. Pipalova, J. Hola and J. Sandula. 1995. Hemopoiesis-enhancing effects of repeatedly administered carboxymethylglucan in mice exposed to fractionated irradiation. Folia Biologica. 41: 249-256.

Hunter, K.W., R.A. Gault Jr. and M.D. Berner. 2002. Preparation of micropaticulate beta-glucan from *Saccharomyces cerevisiea* for uses in immune potentiation. Appl Microbiol. 35 : 267-271.

Jamas, S., C. Rha and A.J. Sinskey. 1991. Glucan compositions and process for preparation there of. US Patent 5,028,703.

Jazwinski, S.M. 1990. Preparation of extraction from yeast, In Deutscher, A.H.(ed.), Method Enzymol, pp. 154-174. London: Acedemic Press.

Jones, R.P., N. Pamment and P.F. Greenfield. 1981. Alcohol fermentation by yeast-the effect of environmental and other variables. Proc. Biochem. 16: 42-49.

Kapteyn, J.C., R.C. Montijn, E. Vink, A. Llobell, J.E. Douwes, H. Shimoi, P.N. Lipke and F.M. Klis. 1996. Retention of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall proteins

through a phosphodiester-linked β-1,3-/β-1,6- glucan heteropolymer. Glycobiol. 6: 337-345.

Kelly, M. 1983. Yeast extract, In Godfrey, T. and Reichelt, J.(eds.), The Application of Enzyme in Industry, pp. 457-465. London: Acedemic Press

Kerckhoffs, A., AJM. Danielle, H. Gerard and R.P Mensink. 2004. Cholesterol-lowering effect of beta-glucan from oat bran in mildly hypercholesterolemic subjects may decrease when beta-glucan is incorporated into bread and cookies. Am J Clin Nutr. 78: 221-227.

Kim, K.S. and H.S., Yun. 2006. Production of soluble beta-glucan from the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. Enzyme MicrobTech. 39: 496-500.

Kim, K.S., J.E., Chang, and H.S., Yun. 2004. Estimation of soluble β-glucan content of yeast cell wall by the sensitivity to Glucanex® 200G treatment. Enzyme Microb Tech. **35**:672-677.

Klis, F.M., P. Mol, K. Hellingwerf and S. Brul. 2002. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiol Rev. 26: 239-356.

Kogan, G., L. Masler, J. Sandula, J. Navarova and T. Trnovec. 1989. Recent results on the structure and immunomodulating activities of yeast glucan. Biomed. And biotech. Adv. Indust. Polysac. 31: 251-258

Kollar, R., E. Sturdik and J. Sajbidor. 1992. Complete fractionation of *Saccharomyces cerevisiae* biomass. Food Biotechnol. 6(3): 225-237.

Koller, R., B. Reinhold, E. Petrakova, H.J. Yeh, G. Ashwell, J. Dragonova, J.C. Kapteyn, F.M. Klis and E. Cabib. 1997. Architecture of the yeast cell wall. β(1,6)-glucan interconnects mannoprotein, β(1,3)-glucan, and chitin. J. Biol. Chem. 272: 17762-17775.

Lee, B.Y. and J.K. Kim. 2001. Production of *Candida utilis* biomass in different culture types. Aquacult. Eng. 25: 111-124.

Lee, J.N., D.Y. Lee, I.H. Ji, G.E. Kim and H.N. Kim. 2001. Purification of soluble β-Glucan with immune enhancing activity from the cell wall of yeast. Biosci. Biotechnol. Biochem. 65(4): 837-841.

Manners, D.J., A.J. Masson and J.C. Patterson. 1973. The Structure of a β-(1→3)-D-Glucan from yeast cell walls. Biochem. J. 135:19-30.

Mazur, P. and W. Baginsky. 1996. In vitro activity of 1,3-β-D-Glucan synthase requires the GTP-binding protein Rho1. J. Biol. Chem. 271: 14604-14609.

Nagodawithana, T.W. 1991. Baker's Yeast Production. In Yeast Technology, 2nd edition. pp. 261-314. New York: AVI Publishing Co. Inc.

Nguyen, T.H., G.H., Fleet, and P.L., Rogers. 1998. Composition of the cell walls of several yeast species. Appl Microbial Biotechnol. **50**:206-212.

Nicolosi, R., S.J. Bell and B.R. Bistrain. 1999. Plasma lipid changes after supplementation with beta-glucan fiber from yeast. Am. J. Clin. Nutr. 70: 208-212.

Pelizon, A.C., R. Kaneno, A.M.V.C. Saores, D.A. Meira and A. Sartori. 2004. Immunomodulatory activities associated with β-glucan derived from *Saccharomyces cerevisiae*. Physiol. Res. 54: 557-564.

Reed, G. and T.W. Nagodawithana. 1991. Yeast Technology. 2nd ed. New York: Van Nostrand Reinhold.

Ren, Y., P.R. Ellis, S.B. Ross-Murphy, Q. Wang and P.J. Wood. 2003. Dilute and semi-dilute solution properties of (1,3),(1,4)-b-D-glucan, the endosperm cell wall polysaccharide of oats (*Avena sativa* L.). Carbohyd. Polym. 53: 401-408.

Riggi, S.J. and N.R.D. Luzio. 1961. Identification of RE stimulating agent in zymosan. Am. J. physiol. 200: 297-305.

Robertsen B., G. Rorstad, R. Engstad and J. Ra. 1990. Enhancement of non specific Disease resistant in atlantic salmon, Salmo salar L., by glucan from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. J. fish dis. 3: 391-400.

Roemer, T., G. Paravicini, M.A. Payton and H. Bussey. 1994. Characterization of the yeast (1,6)-β-glucan biosynthetic components, Kre6p and Skn1p, and genetic interactions between the PKC1 pathway and extracellular matrix assembly. J. Cell Biol. 127: 567-579.

Roh, D.H. 2002. Rho1p mutations specific for regulation of beta (1,3) glucan synthesis and the order of assembly of the yeast cell wall. Mol. Microbiol. 44(5): 1167-1183.

Rose, A.H. and J.S. Harrison. 1970. The Yeasts. Vol.2. London: Academic Press.

Rose, A.H. and J.S. Harrison. 1971. The Yeasts. Vol.3. London: Academic Press.

Ross, G.D., V. Vetvicka, J. Yan, Y. Xia and J. Vetvicka. 1999. Therapeutic intervention with complement and beta-glucan in cancer. Immunopharmacology. 42 : 61-74.

Ruiz-Herrera J. 1992. Fungal Glucans. In: Fungal Cell Wall: Structure, Synthesis, and Assembly. pp. 59-88. London: CRC Press.

Saito, H., Y. Yoshioka, N. Uchara, J. Aketagawa, S. Tanaka and Y. Shibata. 1991. Relationship between conformation and biological response for (1,3)-β-D-glucans in the activation of coagulation Factor G from limulus amebocyte lysate and host-mediated antitumour activity. Demonstration of single-helix conformation as a stimulant. Carbo.Res. 217: 181-190.

Selbmann, L., S. Crognale and M. Petruccioli. 2004. Beta-glucan production by *Botryosphaeria rhodina* in different bench-top bioreactors. J. Appl. Microbiol. 96(5): 1074-1081.

Shematek, E.M. and E. Cabib. 1980. Biosynthesis of the yeast cell wall. II. Regulation of beta-(1 leads to 3) glucan synthetase by ATP and GTP. J. Biol. Chem. 255(3): 895-902.

Synowiecki, J. and A.K.N. Ali. 2003. Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives. Food sci nutr. 43(2): 145-171.

Temeli, F. and Z. Burkus. 2000. Stabilization of emulsions and foams using barley β-glucan. Food Res Int. 33 : 27-33.

Thammakiti, S., M. Suphantharika, T. Phaesuwan, and C. Verduyn. 2002. Preparation of spent brewer's yeast β-glucan for potential applications in the food industry. Food Sci Technol. 39: 21-29.

Vereschagin, E.I., T.A. Korolenko and J. Sandula. 1994. Protective effect of β-1,3-d-carboxymethylglucan in acute massive blood loss (in Russian). Patolog. Fiziolog. Exp. Terap. 3: 33-35.

Walker, G. M. 1998. Yeast Physiology and Biotechnology. p. 11-50. *In* Yeast Cytology. John Wiley and Sons, England.

Williams, D.L., A. Mueller and W. Browder. 1996. Glucan-based macrophage stimulators: a review of their anti-infective potential. Clin. Immunother. 5: 392-399.

Williams, D.L. and R.Di. Lunzig. 1980. Glucan-induced modification of marine viral hepatitis. Science. 208(4): 67-69.

Worrasinchai, S., M. Suphantharika, S. Pinjai, and P. Jamnong. 2005. β-glucan prepared from spent brewer's yeast as a fat replacer in mayonnaise. Food Hydrocolloids: 1-11.

Zulli, F., F. Suter, H. Biltz, H.P. Nissen and M. Birman. 1996. Carboxymethylate beta -(1-3)-glucan. Cosmetic & Tolletries. 111 : 91-98.

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Yeast malt extract (YM)

กลูโคส (glucose)	10	กรัม
เพพโตน (peptone)	5	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	3	กรัม
สารสกัดจากมอลต์ (malt extract)	3	กรัม

ละลายสารสี่ชนิดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สำหรับการเตรียม YM ที่ค่าความเป็นกรดเบส 4.5 ทำได้โดยปรับค่าความเป็นกรดเบสด้วยสารละลายไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 โมลาร์ก่อนน้ำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Yeast malt extract (YM)

เตรียมอาหารด้วยวิธีเดียวกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM แต่ละลายวุ้น 15 กรัมต่ออาหาร 1 ลิตร เพิ่มลงไป จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

สูตรและวิธีการเตรียมสารละลาย

1. การเตรียมกากน้ำตาล

นำกากน้ำตาลมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) โดยนำกากน้ำตาลมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นตามความเหมาะสมปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายเอนไซม์อินเวอร์เทส 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Somogyi-Nelson

2. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85%

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	0.85	กรัม

ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. สารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 โมลาร์

กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (conc. HCl)	8.33	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น (Distilled water)	100	มิลลิลิตร

4. สารละลายกรดแอซิติก 0.5 โมลาร์

กรดแอซิติกเข้มข้น (conc. CH_3COOH)	2.85	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น (Distilled water)	100	มิลลิลิตร

5. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	4.0	กรัม

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. สารละลายเอนไซม์อินเวอร์เทส (invertase)

6.1 สารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์

โซเดียมอะซิเตต	9.10	กรัม
กรดอะซิติก	1.9	มิลลิลิตร

ละลายโซเดียมอะซิเตตในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร เติมกรดอะซิติก ปรับ pH เป็น 4.5 แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

6.2 สารละลายเอนไซม์อินเวอร์เทส

เอนไซม์อินเวอร์เทส	0.15	กรัม
สารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์	100	มิลลิลิตร

ละลายเอนไซม์อินเวอร์เทส 0.15 กรัม ในสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1

7. รีเอเจนต์สำหรับหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Somogyi-Nelson (Nelson,1944; Somogyi, 1952)

7.1 อัลคาไลน์ คอปเปอร์ รีเอเจนต์ (Alkaline copper reagent)

ละลายโซเดียมไฮโดรเจนฟอตเฟส ($Na_2HPO_4.12H_2O$) 71 กรัม และโรเชลซอลท์ ($K_2C_4H_4O_6.4H_2O$) 40 กรัม ในน้ำกลั่น 700 มิลลิลิตร เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 1 N ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$) เข้มข้น 10% ปริมาตร 80 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วปรับปริมาตรสุดท้าย

7.2 เนลสัน รีเอเจนต์ (Nelson's reagent)

ละลายแอมโมเนียมโมลิบเดท ($(NH_4)6MoO_2 4.4H_2O$) 53.2 กรัม ในน้ำปลอดประจุ 900 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (conc. H_2SO_4) 21 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมสารละลายโซเดียมอาซีเนท ($NaHAsO_4.7H_2O$) ความเข้มข้น 12% ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำปลอดประจุ เก็บในขวดสีชา ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ถ้ามีตะกอน กรองออกก่อนนำไปใช้

8. การคำนวณหา μ $Y_{x/S}$ และ Productivity

$$\mu = \frac{\ln X_t - \ln X_o}{t}$$

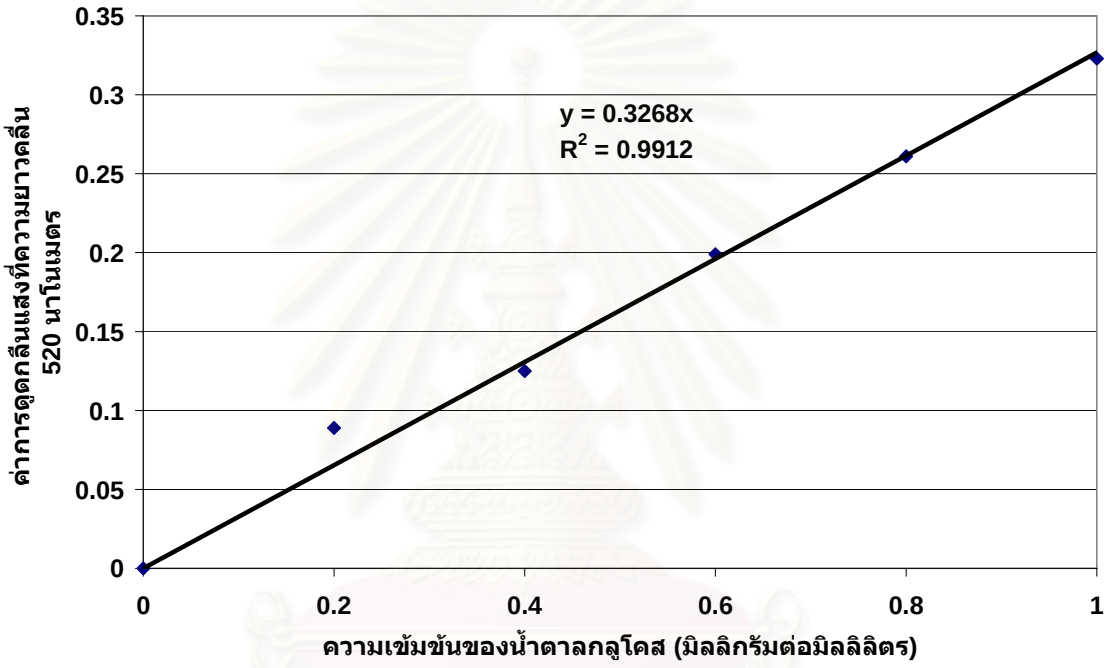
$$Y_{X/S} = \frac{X_t - X_0}{S_0 - S_t}$$

$$\text{Productivity} = \frac{P_t - P_0}{t}$$

ภาคผนวก ค

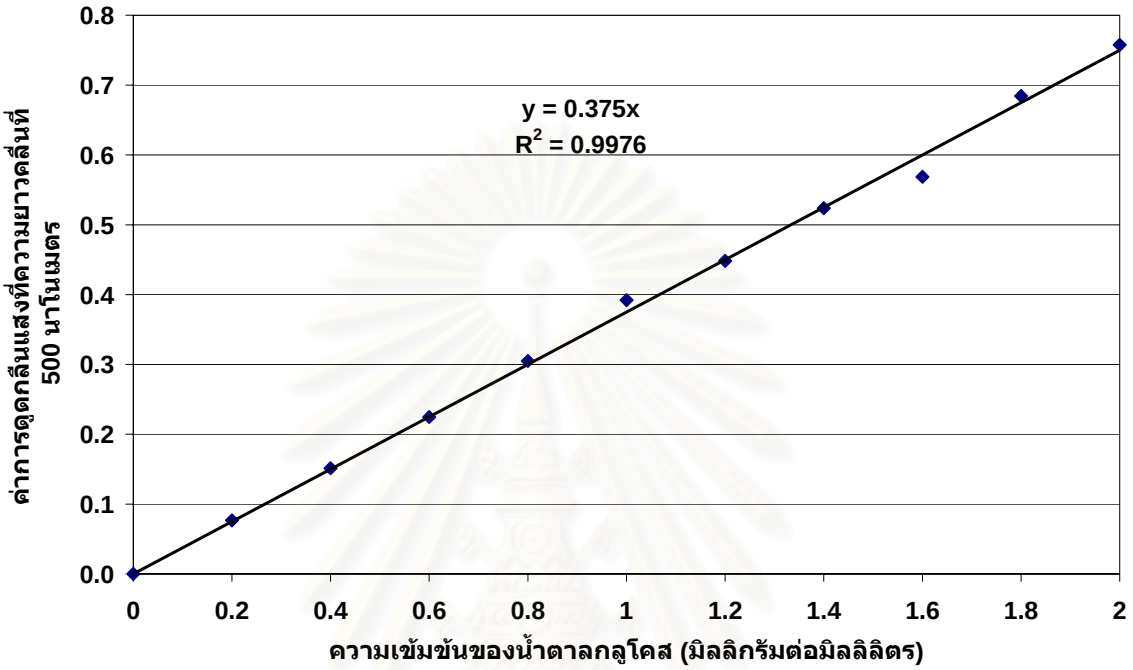
กราฟมาตรฐาน

1. กราฟมาตรฐานการวิเคราะห์น้ำตาลด้วยวิธี Somogyi-Nelson (Nelson,1944; Somogyi, 1952)



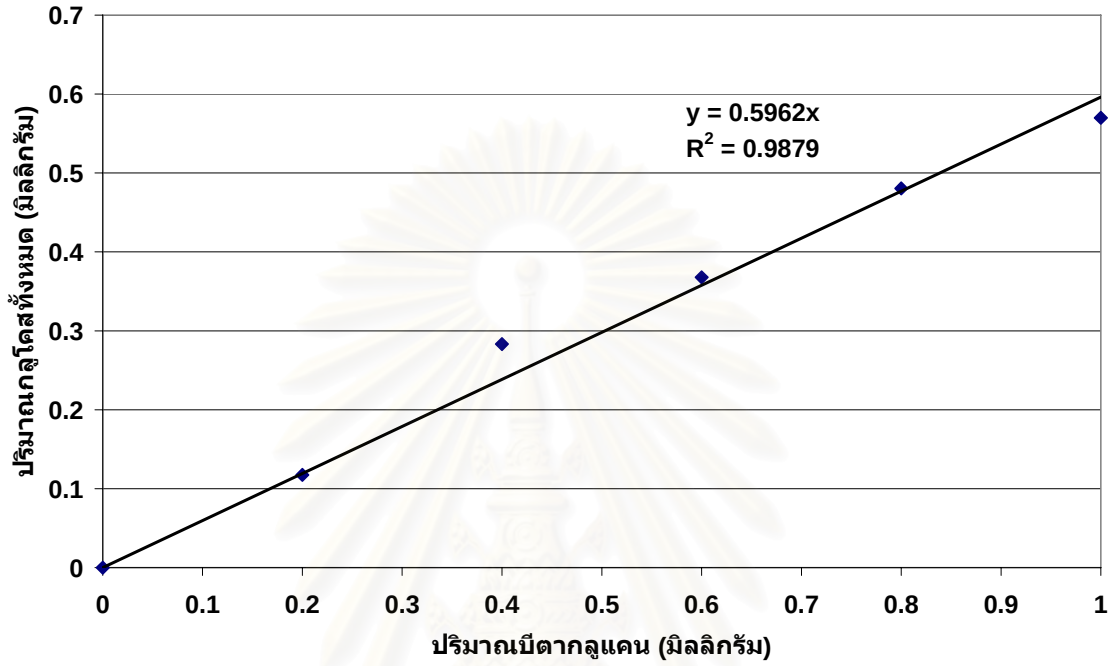
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. กราฟมาตรฐานการวิเคราะห์น้ำตาลกลูโคสโดยวิธี peroxidase/glucose oxidase assay (Cerreia และคณะ,2000)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. กราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกลูโคสที่ได้จากการไฮโดรไลซ์บีตากลูแคนโดยใช้ผลิตภัณฑ์ Innovacan ™ เป็นสารมารตรฐาน



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง

รายละเอียดของชุดทดสอบในการจัดจำแนกสายพันธุ์ยีสต์ (API ID 32 C)

ตารางแสดงองค์ประกอบ(ชนิดคาร์โบไฮเดรต) ของชุดทดสอบ ID 32 C

Capules	Tests	substrates	QTY(mg/cup.)
1.0	GAL	D-Galactose	0.70
1.1	ACT	Cycloheximide (ACTidione)	0.014
1.2	SAC	D-Saccharose (sucrose)	0.66
1.3	NAG	N-Acetyl-Glucosamine	0.64
1.4	LAT	Lactic acid	0.64
1.5	ARA	L-Arabinose	0.70
1.6	CEL	D-Cellobiose	0.66
1.7	RAF	D-Raffinose	2.34
1.8	MAL	D-Moltose	0.70
1.9	TRE	D-Trehalose	0.66
1.A	2KG	Potassium 2-Ketogluconate	1.09
1.B	MDG	Methyl-αD-Glucopyranoside	1.92
1.C	MAN	D-Mannitol	0.68
1.D	LAC	D-Lactose (bovine origin)	0.70
1.E	INO	Inositol	0.70
1.F	0	No substrate	-
0.0	SOR	D-Sorbitol	2.72
0.1	XYL	D-Xylose	0.70
0.2	RIB	D-Ribose	0.70
0.3	GLY	Glycerol	0.82
0.4	RHA	L-Rhamnose	0.68
0.5	PLE	Palatinose	0.66
0.6	ERY	Erythriol	1.44

ตารางแสดงองค์ประกอบ(ชนิดคาร์โบไฮเดรต) ของชุดทดสอบ ID 32 C (ต่อ)

Capules	Tests	substrates	QTY(mg/cup.)
0.7	MEL	D-Melibiose	0.66
0.8	GRT	Sodium Glucuronate	0.76
0.9	MLZ	D-Melezitose	0.66
0.A	GNT	Potassium Gluconate	0.92
0.B	LVT	Levulinic acid (Levulinate)	0.48
0.C	GLU	D-Glucose	0.78
0.D	SBE	L-Sorbose	0.70
0.E	GLN	Glucosamine	0.68
0.F	ESC	Esculin Ferric citrate	0.28 0.069

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ส่วนประกอบของ API C Medium

Ammonium sulfate	5 g
Monopotassium phosphate	0.31 g
Dipotassium phosphate	0.45 g
Disodium phosphate	0.92 g
Sodium chloride	0.1 g
Calcium chloride	0.05 g
Magnesium sulfate	0.2 g
L-Histidine	0.005 g
L-Tryptophan	0.02 g
L-Methyonine	0.02 g
Gelling agent	0.5 g
Vitamin solution	1 ml
Trace elements	10 ml
Demierelized water	To make 1000 ml
Final pH :6.4-6.8 at 20-25 ^{o}C	

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวนิชนันท์ ชวนชื่น เกิดเมื่อวันที่ 23 กรกฎาคม พ.ศ. 2525 ที่จังหวัด กาญจนบุรี สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาจากโรงเรียนหอวัง สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยมหิดล เมื่อปีการศึกษา 2547 และเข้าศึกษาต่อในระดับวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต หลักสูตรจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2548

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย